

GENÉTICA MOLECULAR DE LA HEMOFILIA A EN UNA FAMILIA COLOMBIANA CON
DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND Y DE HEMOFILIA A

Diana Carolina Polanía Villanueva

Trabajo de Tesis para optar al título de Magíster en Ciencias Biológicas

Helena Groot de Restrepo

Directora

Diana María Narváez Noguera

Codirectora

Universidad de Los Andes

Laboratorio de Genética Humana

Bogotá D.C.

2014

Agradecimientos

A Dios, por ser pintor perfecto en el lienzo de mi vida.

A la Dra. Helena Groot de Restrepo, por quien hago mis sueños realidad.

A Diana Narváez, un ser humano increíble, una amiga que la saca del estadio.

A mi esposo, por ser columna y fortaleza. El amor de mi vida.

A mi hija por ser el motor, la razón del por qué luchar y la alegría.

A mi familia, por su paciencia, apoyo incondicional, consejo y guía.

A los integrantes del Laboratorio de Genética Humana, por su colaboración, sus palabras y por dejar tan buena huella en mi caminar.

Resumen

El factor de von Willebrand (FvW) circula en el plasma formando un complejo con el factor VIII (FVIII) de la coagulación por enlaces no covalentes. Esta interacción evita la degradación enzimática del FVIII y asegura su transporte al lugar de la formación del coágulo de fibrina. Allí el FVIII es activado a FVIIIa y actúa como co-factor para el factor IX activado, quien a su vez, activa un paso más en la cascada de coagulación sanguínea. Debido a su estrecha relación, la disminución de la actividad de uno u otro puede afectar la actividad de uno de los dos, lo que genera un diagnóstico clínico no tan preciso en cuanto a qué enfermedad se padece, si Hemofilia A o Enfermedad de von Willebrand. En el presente trabajo se reporta el caso de una familia colombiana que padecía las dos enfermedades, según diagnóstico clínico, debido a que algunos de sus miembros tenían menorreas abundantes, hemorragias nasales espontáneas, hematomas frecuentes y niveles bajos de FVIII y FvW en la sangre. Sin embargo, dicha familia carecía de un estudio genético que permitiera verificar y contrastar el diagnóstico que hacen las entidades de salud. Adicionalmente, en muchas ocasiones se cataloga la Enfermedad de von Willebrand como un tipo de Hemofilia leve e incluso se desconoce su existencia. En este caso, se realizó un diagnóstico genético por pruebas moleculares que detectan la presencia de las inversiones más comunes en los intrones 1 y 22 mediante PCR de fragmentos largos (LD – PCR), además de la secuenciación general del gen del FVIII, que hasta el momento no se había publicado en Colombia. Se encontraron dos mutaciones sinónimas en los exones 14 y 26, lo que descarta un efecto dañino sobre la proteína del FVIII y por tanto desvirtúa la presencia de Hemofilia A en la familia. Se plantea la posibilidad de un caso de Enfermedad de von Willebrand únicamente. El estudio muestra la necesidad que hay en el país de ampliar y estandarizar las pruebas clínicas y de

incluir el diagnóstico genético en la detección adecuada de las dos coagulopatías, en casos de ambigüedad en el diagnóstico.

Palabras claves: Hemofilia A, Gen del Factor VIII, Enfermedad de von Willebrand.

Introducción

La Hemofilia A (HA) (OMIM #306700) es un trastorno genético recesivo ligado al sexo, que da como resultado una deficiencia en la actividad coagulante del Factor VIII o Factor Antihemofílico A (FVIII) del plasma, siendo la frecuencia de incidencia de 1:5,000 y 1:10,000 niños varones nacidos vivos dependiendo de la población (Graw et al. 2005; Kasper 2008; Rick et al. 2003). La Enfermedad de von Willebrand (EvW) (OMIM #193400); por su parte, es un trastorno hereditario autosómico en el que hay deficiencia o disfunción del factor von Willebrand (FvW). La EvW afecta alrededor del 1% de la población mundial y se considera el trastorno de coagulación menos severo (Lilicrap 2008).

El gen del FVIII se ubica en el brazo largo del cromosoma X. Comprende 186 kb, 26 exones y 25 intrones, algunos de ellos muy grandes como el intrón 22 (16424 pb). Este gen tiene dos copias intragénicas (FVIII A y FVIII B) dentro del intrón 22 y dos copias extragénicas del gen FVIII A en la región telomérica que son altamente homólogas con las intragénicas (Graw et al. 2005). El gen del FvW se ubica en el brazo corto del cromosoma 12 en la posición p13.3, abarca 178 kb y constituye 52 exones cuyo tamaño oscila entre 1.3kb (exón 28) y 40 pb (exón 50) (Robertson et al. 2008).

El FvW es una proteína de 2050 aminoácidos que contiene varios dominios con funciones concretas; así por ejemplo, el dominio D'/D3 se une al FVIII, el dominio A1 se une al receptor GPIb de las plaquetas y la heparina, y el dominio A3 se une al colágeno. No es una enzima y por tanto no tiene actividad catalítica, su función primaria es unirse al FVIII y facilitar la adhesión de las plaquetas al tejido conectivo subendotelial en las heridas. El FVIII, por su parte, es una glucoproteína de 2351 aminoácidos que tras ser estabilizado por el FvW actúa como cofactor de la cascada de coagulación (Koedam et al. 1990). En el plasma, la molécula de FVIII es escindida para producir dos péptidos, una cadena amino terminal pesada (dominios A1, A2, B) y una cadena carboxi terminal liviana (A3, C1, C2). La proteína circula como un dímero, con iones de calcio ligando entre sí las dos cadenas mediante el enlace de los dominios A y C. Cuando se la activa con trombina, la cadena pesada se escinde, liberando el dominio B, que no se requiere para la actividad de la coagulación (Anexo 1). La trombina generada durante el proceso de coagulación potencia la actividad coagulante (Shen et al. 2008).

Tanto el FvW como el FVIII juegan un papel importante en la hemostasia para formar un retículo de fibras de fibrina estable en los coágulos de sangre (Martínez – Murillo 2006). El FvW circula en el plasma, estabiliza y forma un complejo con el FVIII por enlaces no covalentes (Devlin 2006). Esta interacción evita la degradación enzimática del FVIII y asegura su transporte al lugar de la formación del coágulo de fibrina, en donde promueve la adhesión y agregación plaquetaria al subendotelio. Allí el FVIII es activado a FVIIIa y actúa como co-factor para el factor IX activado, el cual promueve un paso más en la cascada de coagulación sanguínea hasta formar el coágulo.

En el último reporte de la Federación Mundial de la Hemofilia se identificaron 268,030 personas que viven con desórdenes de coagulación en 108 países, con un incremento de 10,848 personas con respecto al reporte del año anterior (WFH 2012). En Colombia se calculan aproximadamente unos 2.800 pacientes. En el 2008, por ejemplo, se reportaron en el país, 1658 pacientes con Hemofilia, 1.255 con Hemofilia A, 272 con Hemofilia B y 131 con Hemofilias de tipo desconocido. Sólo 1.446 hemofílicos están registrados en la Liga Colombiana de Hemofilia, incluyendo 54 con desarrollo de inhibidores, 303 casos de Hemofilia B y 208 casos de EvW (Colhemofílicos 2014).

La EvW en particular, es una anomalía en la cantidad como en la estructura del FvW y se traduce en una alteración de la función plaquetaria en lo que respecta a su adhesión para formar el tapón blando o trombo blanco. Aunque el FvW actúa como transportador y estabilizador del Factor VIII, su principal función es participar en la función plaquetaria, concretamente en la adhesión de las plaquetas a las fibras de colágeno que quedan al descubierto tras una herida o daño endotelial, hecho que inicia una cascada de interacciones entre las plaquetas, el FvW y las glucoproteínas Ib/IX y IIb/IIIa, hasta unirse al fibrinógeno, para mediar la agregación plaquetaria irreversible. En la actualidad, la clasificación de la EvW se realiza con base en la concentración plasmática del FvW, a la actividad biológica y a los patrones de los multímeros (Figura 1).

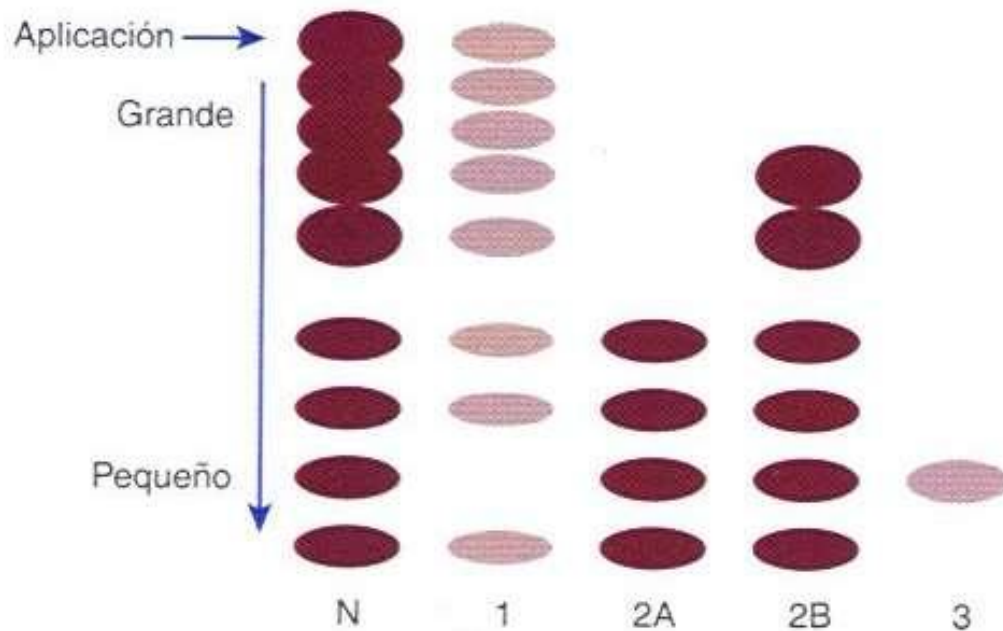


Figura 1. Análisis de multímeros del FvW por electroforesis. Disminución en el tipo 1, ausencia en el tipo 2 y ausencia de casi todos los multímeros en el tipo 3 (Tomada de Rodak, 2005).

Así, por ejemplo, la EvW tipo 1 hace referencia a la deficiencia de producción del FvW. Es autosómica dominante y polimórfica. Los niveles del FvW y del FVIII son variables aunque siempre se encuentran disminuidos, lo que causa hemorragia sistémica leve o moderada. Esta es la forma más común y se observa en casi el 80% de los afectados por la EvW. El subtipo 2A se da en el 10-20% de los pacientes con EvW. Se produce por mutaciones autosómicas dominantes que afectan al dominio estructural A de la molécula del FvW que la hacen más sensible a la degradación en el plasma. La concentración del FvW es casi normal pero hay menos multímeros de peso molecular alto e intermedio que son los que participan más íntimamente en la agregación plaquetaria. La EvW subtipo 2B se debe a mutaciones que afectan al dominio A1 lo que se traduce en un aumento de la afinidad por la glucoproteína plaquetaria Ib/IX lo que hace que los multímeros grandes se unan espontáneamente a las plaquetas y no estén disponibles para la

adhesión plaquetaria normal. El subtipo 2M es una variante cualitativa con disminución de interacción plaquetaria y tiene un patrón multimérico normal. Se confunde en el diagnóstico con el tipo 1. La EvW variante Normandía, subtipo 2N o Hemofilia autosómica se produce a causa de una mutación autosómica en el dominio donde se une al FVIII, por lo que se encuentra afectada su estabilidad en plasma. Esta mutación genera niveles normales del FvW, pero niveles bajos de del FVIII, de ahí que pueda confundirse con HA. Puede ocasionar hemorragias anatómicas leves en hombres y mujeres. Finalmente, la EvW tipo 3 es donde el FvW está ausente o prácticamente ausente con lo que no se produce la estabilización del FVIII y por lo tanto los síntomas son semejantes a los de una HA grave (Rodak 2005).

Factores como el sistema eritrocitario ABO del individuo pueden influir en la presentación y patología de la EvW. Aquellos individuos con grupo sanguíneo O tienen un nivel medio menor al de personas con otros grupos sanguíneos. A menos que el antígeno de FvW específico del grupo ABO referencie rangos habituales, los individuos del grupo O pueden ser diagnosticados erróneamente con EvW tipo 1. Algunas personas de grupo sanguíneo AB con un defecto genético de FvW pueden pasar por alto el diagnóstico porque los niveles son elevados debido a su grupo sanguíneo (Jiménez et al. 2012).

Cabe resaltar que desde el punto de vista del diagnóstico clínico las dos enfermedades son difícilmente distinguibles, pues las dos proteínas (FVIII y FvW) circulan juntas en la sangre y la disminución en la cantidad del FVIII también puede significar una disminución del FvW (Spronk et al. 2003; Mannucci 2002). Tanto la EvW como la HA presentan heterogeneidad alélica y expresividad variable (Leiria et al. 2009). La expresividad variable, por ejemplo, es analizada

dependiendo de la cantidad de FVIII o FvW en la sangre, a partir de técnicas como Coagulometría y Microelisa, respectivamente. Resultados del nivel de los FVIII ó FvW menores al 1% se clasifican como graves o severos, entre 1 a 5% moderados y entre 5 a 49% leves para FVIII. En el caso del FvW, entre 5 y 60% son considerados casos leves para grupos sanguíneos A, B y AB; y entre 5 – 40% casos leves para el grupo sanguíneo O (Rodríguez – Martorel et al. 2009). Adicionalmente, las dos enfermedades se describen como hemorragias o hematomas frecuentes o esporádicos sin causa aparente o ante un traumatismo en las superficies mucosas de nariz y boca. En casos severos, las hemorragias ocurren en las articulaciones mayores de las extremidades (rodillas, tobillos y codos) y, en menor grado, en caderas, hombros y músculos grandes. Con frecuencia, las mujeres con EvW presentan menorragia y abortos con hemorragias severas (Kasper 2008). Esto como consecuencia de que dicha enfermedad puede afectar por igual a hombres y mujeres, a diferencia de la Hemofilia, que en la mayoría de los casos sólo es padecida por hombres.

La sintomatología aparentemente similar puede llevar a dar diagnósticos poco acertados de la condición clínica de los pacientes. En algunos casos, incluso se puede llegar a diagnosticar Hemofilia, cuando quizás la enfermedad presente sea von Willebrand o viceversa. Adicionalmente, las entidades de salud hacen inferencias sobre el genotipo de los pacientes, atribuyéndoles el ser portadores o no de dichas enfermedades, sin corroborar los resultados de laboratorio con el correspondiente estudio genético. El presente trabajo estudió el primer reporte en Colombia de una familia con doble diagnóstico clínico de HA y EvW y buscó comprobar genéticamente si dicho diagnóstico era cierto, basándose en el análisis molecular del FVIII.

Materiales y Métodos

Diseño de la investigación y muestra de estudio

La investigación realizada es un estudio de caso, de tipo analítico - molecular donde se tuvo como muestra una familia colombiana, que cuenta con tres generaciones (Figura 2), para un total de 5 personas de ambos sexos entre los 6 y 65 años. Según diagnóstico clínico de las diferentes Entidades Promotoras de Salud (EPS), la familia presentaba: un niño con HA y EvW (Figura 2. Individuo III.1), una mujer que padece EvW (Figura 2. Individuo II.1) y una mujer portadora de HA (Figura 2. Individuo II.2) (Anexo 2). Los otros dos integrantes de la familia no habían sido diagnosticados clínicamente, pese a que la mujer I.1 podría portar o padecer una o dos de las enfermedades, por tener síntomas como menorragias, hematomas esporádicos espontáneos, anemia, entre otros.

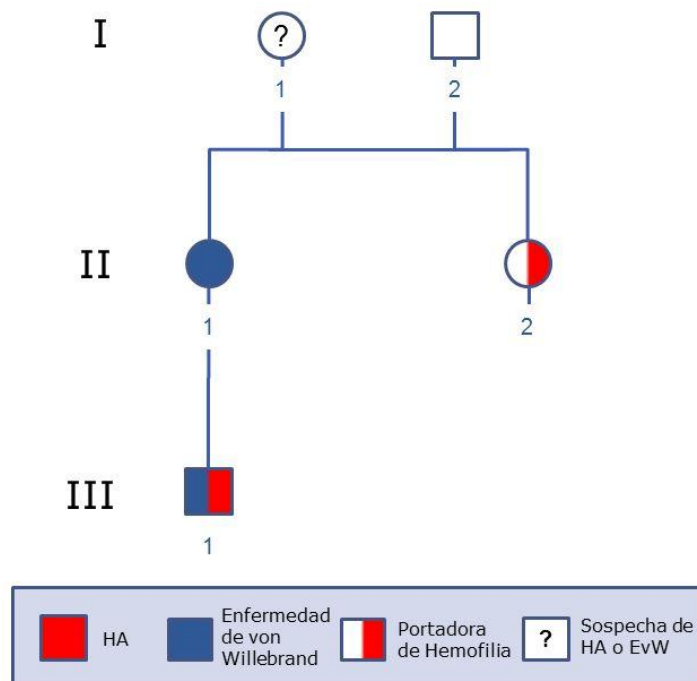


Figura 2. Genealogía de la familia objeto de estudio.

Los miembros de la familia que participaron en el proyecto firmaron un consentimiento informado en el que autorizaron la toma de muestras de sangre y el uso de su material genético en este estudio. El presente trabajo fue aprobado por el comité de ética de la Universidad de Los Andes.

Toma de muestras

Se tomaron en tubos con EDTA dos muestras de sangre periférica a cada persona, por un profesional de la salud autorizado, una para el diagnóstico clínico y otra para el diagnóstico genético.

Diagnóstico clínico de las dos enfermedades

Para corroborar el diagnóstico clínico previo, se hizo un segundo diagnóstico clínico a los cinco miembros de la familia, esta vez no por cada EPS, sino en un solo Laboratorio de Referencia en Hemostasia para garantizar que todas las pruebas se hicieran con las mismas técnicas y tuvieran los mismos valores de referencia. Se solicitaron las mismas pruebas aprobadas por el Plan Obligatorio de Salud (POS) para estas coagulopatías: la actividad del FVIII (también llamada Antígeno plasmático del FVIII) y la actividad del FvW (también llamada actividad del cofactor ristocetina/del factor von Willebrand FvW:RCo o FvW:Act) (Kitche et al. 2010).

Extracción de ADN

Una vez recolectadas las muestras, se aislaron de ellas 350 µl de leucocitos y se hizo extracción de ADN por el método de *salting-out* (Gaaib et al. 2011) utilizando el kit de CorpoGen

DNA2000. Se cuantificó la concentración de ADN mediante Nanodrop para la posterior amplificación.

Diagnóstico genético de HA

Con el fin de abordar el problema de dos enfermedades en la familia se buscó descartar genéticamente la presencia de HA y con ello reducir el doble diagnóstico a una sola condición posible, EvW. El análisis molecular incluyó la detección de las dos mutaciones más frecuentes en casos de HA: las inversiones 1 y 22. Por otra parte, se estableció el genotipo del gen del FVIII en cada individuo, mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Técnicas Moleculares para el diagnóstico genético de HA

Inversiones de los intrones 1 y 22

La detección de las inversiones de los intrones 1 y 22 fue el primer paso en el filtro de mutaciones, pues en el caso de la inversión 22 se encuentra en el 40 a 50% de los pacientes con HA severa (Poggi et al. 2011). Para detectarlas fue necesario usar una variación de la PCR, el análisis llamado Long-Distance PCR (LD-PCR), técnica basada en la Metodología de Liu et al. (1998) y recientemente adaptada por Garcés-Gutiérrez (2012). Así, se realizó la reacción con mezclas de parejas de primers de acuerdo con lo reportado por Polakova et al. (2003). En la mezcla de PCR se usó el kit Platinum® PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen) con los siguientes componentes ya incorporados: *Taq* DNA polimerasa, polimerasa termoestable de la especie *Pyrococcus GB-D*, Anticuerpo Platinum® *Taq*; 66 mM Tris-SO₄ (pH 8.9); 19.8 mM (NH₄)SO₄; 2.4 mM MgSO₄; 220 μM dNTPs y estabilizadores. Las condiciones de temperatura para la LD-PCR fueron: una denaturación inicial de 94°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de

denaturación a 94°C por 30 seg, alineamiento a 55°C por 30 seg y una extensión a 68°C por 13 min en cada ciclo. Los productos obtenidos se corrieron en un gel al 0,6% de agarosa a 80V por 3 horas.

Para la detección de la inversión del intrón 1 se usó el protocolo descrito por Bagnall et al. (2002). Se usó la mezcla de primers 9cR, 9F e int1h-2F en la detección de la región int1h-1 y la mezcla int1h-2F, int1h-2R y 9F para la detección de la región int1h-2 y se compararon sus productos de amplificación (Anexo 3). Para la mezcla de reacción se utilizó del mismo modo el kit Platinum ® PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen), pero en una PCR-multiplex en donde se colocaron al tiempo los cuatro primers antes mencionados (Figura 3).

IDENTIFICACION	SECUENCIA
INT22 P	5'-GCCCTGCCTGTCCATTACACTGATGACATTATGCTGAC-3'
INT22 Q	5'-GGCCCTACAACCATTCTGCCTTTCACCTTCAGTGCAATA-3'
INT22 A	5'-CACAAGGGGGAAGAGTGTGAGGGTGTGGGATAAGAA-3'
INT22 B	5'-CCCCAAACTATAACCAGCACCTTGAACCTCCCCTCTCATA-3'

PRIMERS INVERSION 1 FVIII

IDENTIFICACION	SECUENCIA
9cR	5'-CTAGCTTGAGCTCCCTGTGG-3'
9F	5'-GTTGTTGGGAATGGTTACGG-3'
Int1h-2F	5'-GGCAGGGATCTTGTTGGTAAA-3'
Int1h-2R	5'-TGGGTGATATAAGCTGCTGAGCTA-3'

Figura 3. Detalle de la secuencia de los primers usados en la detección de las inversiones 1 y 22 del gen del FVIII de la coagulación.

Las condiciones de temperatura de la PCR-multiplex para la inversión 1 contemplaron una denaturación inicial a 94°C por 30 segundos, seguida de 30 ciclos compuestos de una denaturación a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 55°C por 30 segundos y una extensión a 68°C por 2 minutos. Posteriormente, la observación y análisis de los productos esperados se realizó en un gel de agarosa al 1% y se corrió a 70V por 40 minutos.

Secuenciación del gen del FVIII

La secuenciación se realizó amplificando los 26 exones con ayuda de los primers ya reportados en la base de datos <http://hadb.org.uk/WebPages/Database/Methods/keeneprimers.doc>. (Anexo 4) y bajo las siguientes condiciones de PCR: 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 59°C por 45 segundos y 72°C por 90 segundos. La extensión final fue de 72°C por 5 minutos. Finalmente, se realizó una electroforesis para evaluar los tamaños esperados para cada exón en un gel al 2% de agarosa a 70V por 40 minutos. Posteriormente, se secuenciaron los productos de la PCR por el método de Sanger. Los resultados observados en los 26 exones del gen de la familia estudiada fueron confirmados tres veces. Se repitieron las secuenciaciones con el *Forward* y el *Reverse*, de manera que si en una de ellas había duda de la presencia o no de variación, se corroboró con la otra para evaluar si había diferencias en comparación con la secuencia de referencia. Este procedimiento garantizó la detección de cambios nucleotídicos en el ADN de los pacientes y evitó falsos positivos por artefactos inducidos por la PCR.

Análisis de resultados

A través de la electroforesis y la posterior secuenciación se observaron los fragmentos esperados para cada exón del FVIII. Con ayuda del programa CLC Main Workbench 7 se alinearon las

secuencias de cada individuo con la secuencia consenso proporcionada por NCBI (Bermeo et al. 2007). Para conocer el posible efecto de dichas variaciones se utilizaron tres software, SIFT, PROVEAN y SNPeffector, que permitieron predecir si la sustitución de un aminoácido o un indel tiene algún impacto en la función biológica de la proteína del FVIII (Choi et al. 2012).

Resultados

Se corroboraron los diagnósticos clínicos de los miembros de la familia de estudio en sólo Laboratorio de Referencia en Hemostasia. De acuerdo con estos resultados y con el análisis hecho por el hematólogo de cada EPS de los miembros de la familia, ninguno presenta un FVIII alterado, pero sí hay alteración en el FvW. Los tiempos de Protrombina (TP) y Tromboplastina (TPT) aunque no de forma relevante, se encuentran aumentados en algunos de ellos. (Tabla 1).

INDIVIDUO	Grupo sanguíneo eritrocitario ABO	Tiempo de Protrombina (TP)	Tiempo de Tromboplastina (TPT)	FvW	FVIII
I.1 Sin diagnóstico previo	A⁺	14.1 s.	30 s.	61,3-157.8	50 – 150
		10.4 s.	28.7 s.	81.5	59.9
II.2 Sin diagnóstico previo	O⁺	14.1 s.	30 s.	41.1 – 125.9	50 – 150
		11 s.	30 s.	70.3	68.8
II.1 Mujer con EvW	O⁺	14.1 s.	30.1 s.	41.1 – 125.9	50 – 150
		13.4 s.	31.9 s.	40	57.4
II.2 Mujer portadora de HA	O⁺	14.1 s.	30.9 s.	41.1 – 125.9	50 – 150
		15.50 s.	31.9 s.	70.4	60.4
III.1 Niño con H A y EvW	O⁺	14.1 s.	30.9 s.	41.1 – 125.9	50 – 150
		15.2 s.	31.6 s.	37.8	65.1

Tabla 1. Resultados de exámenes de un Laboratorio de Referencia en Hemostasia. Técnicas aplicadas: TP y TPT: Nefelometría centrífuga; FVIII: Coagulometría; FvW: Microelisa, Inmunoensayo por Turbidimetría. En naranja se muestran los resultados alterados. En rosado los valores de TP y TPT un poco aumentados.

Para confirmar el nuevo diagnóstico clínico, en donde no hay presencia de HA se hizo el diagnóstico genético del gen del FVIII. Inicialmente se evaluó la presencia de las inversiones 1 y 22 en la familia.

La inversión 1, que ocurre por secuencias homólogas, de aproximadamente 1Kb (*Int1h*) opuestamente orientadas y situadas hacia el extremo 5' (*upstream*) en el intrón 1 y 200Kb del FVIII hacia el telómero Xq (Radic 2010) (Anexo 3), no se presentó en ninguno de los miembros de la familia como se puede observar en la Figura 4 (banda de 1.0 Kb).

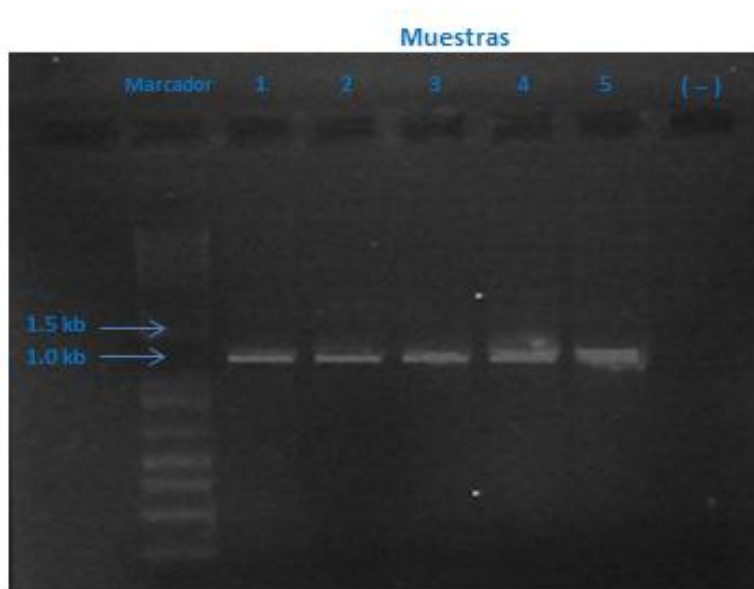


Figura 4. Detección de la inversión 1. Banda de 1.0 kb indica genotipo wildtype; es decir, que ningún miembro de la familia (muestras 1 a 5) presentan la inversión.

Por su parte, la inversión 22 resulta de un intercambio recíproco entre secuencias homólogas de 9,5 Kb (*int22h*), una ubicada dentro del intrón 22 del FVIII (*int22h-1*) y otras dos copias adicionales de *int22h* (*int22h-2 e int22h-3*), ubicadas en posición telomérica, aproximadamente, a 400Kb hacia el extremo 5' (*upstream*) del gen del FVIII (Radic 2010) (Anexo 5). Para dicha

inversión los cinco miembros de la familia obtuvieron bandas en los pozos 1 y 3 correspondientes a los primers P+Q y P+B, respectivamente, bandeado no concordante con el esperado para pacientes sanos, hemofílicos o portadoras (Figura 5).

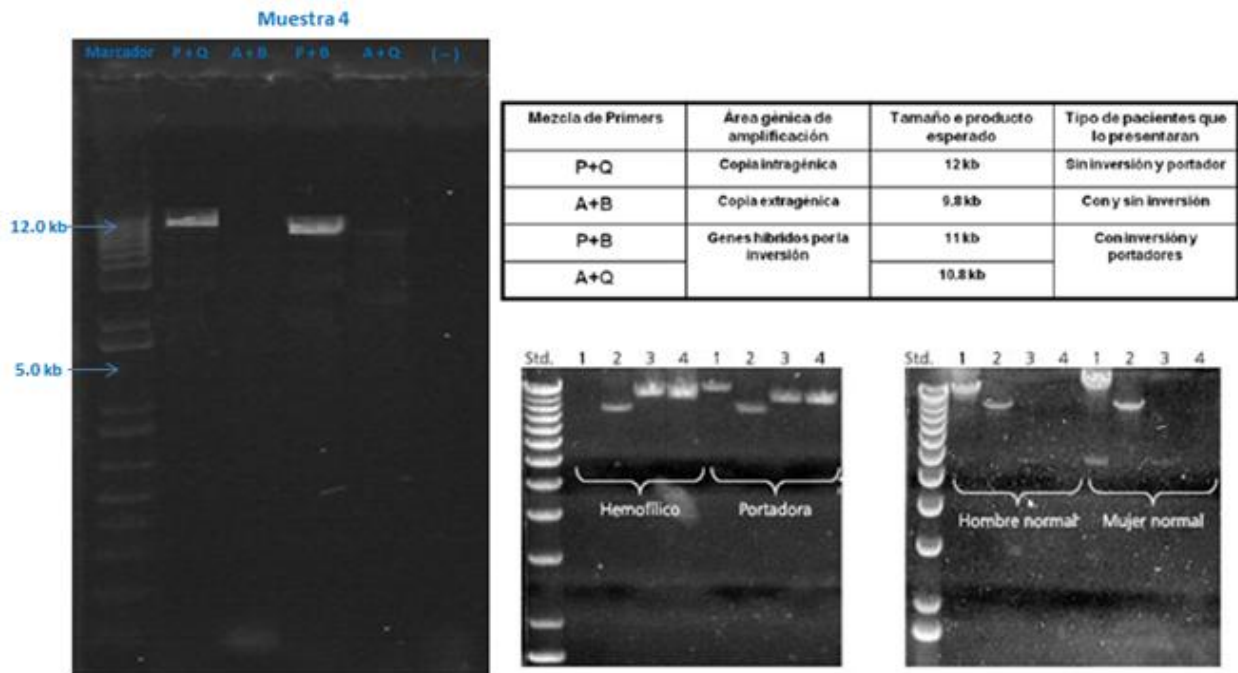


Figura 5. Detección de la inversión 22. A la izquierda resultado obtenido para la mujer II.1 con banda de 12 Kb para el carril con los primers P+Q y de 11 Kb para P+B. A la derecha arriba, resultado de bandas y tamaños esperados según la condición clínica. A la derecha abajo, gel de referencia de lo esperado (Poggi et al. 2011).

El nuevo resultado obtenido para la inversión 22 ratificó la necesidad de realizar la secuenciación general del gen del FVIII. Dicha secuenciación se logró hacer en los cinco miembros de la familia y se obtuvieron los tamaños de banda esperados para cada exón (Anexo 4). Luego de realizar los respectivos alineamientos de las secuencias, se identificaron en la familia dos

variaciones en exones diferentes, ya reportadas en bases de datos como NCBI, Kaviar y HAMSTeRS.

La primera variación identificada como rs1800292 se detectó en el exón 14 de los individuos I.1 (Secuencia 1EX14D), II.1 (4EX14D) y II.2 (3EX14D). En estas secuencias se observó un polimorfismo en forma de heterocigoto, un cambio de una Adenina por una Citosina (Figura 6).

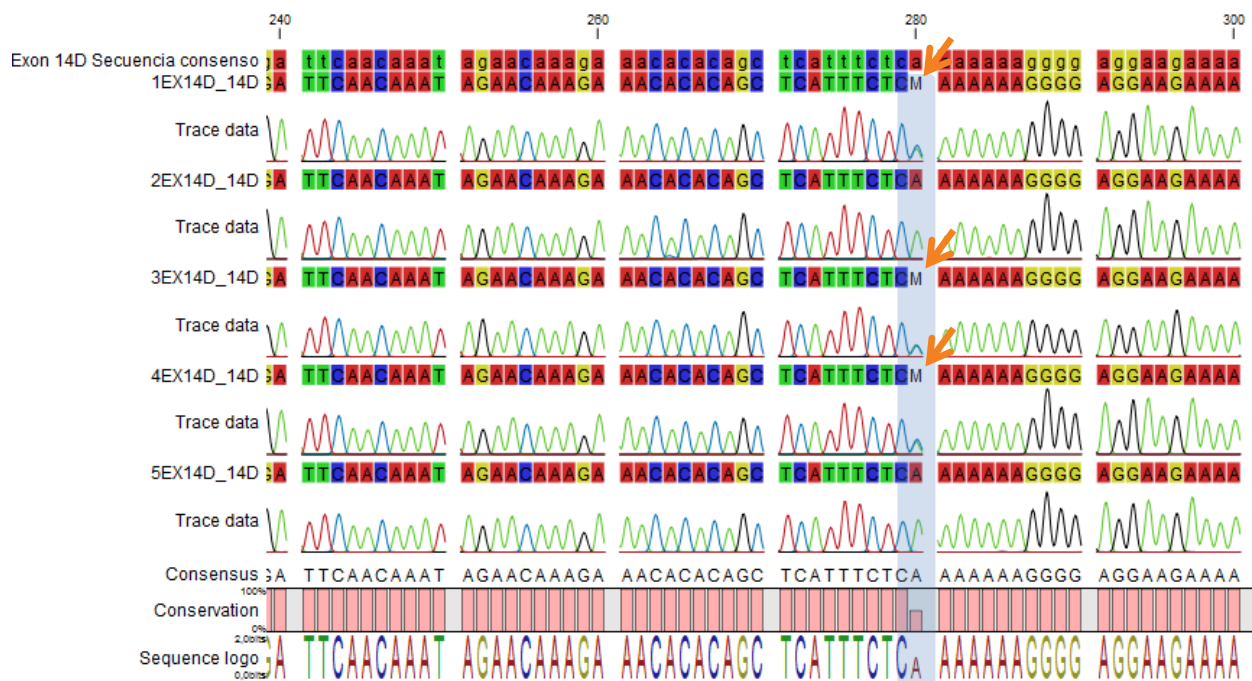


Figura 6. Polimorfismo en el exón 14 de tres miembros de la familia (individuos I.1: Secuencia 1EX14D, II.1: 4EX14D y II.2 3EX14D), cambio de una adenina por una citosina, variación tipo transversión, indicados con flechas naranjas diagonales.

De acuerdo con los resultados arrojados por SIFT y PROVEAN, así como en el reporte de NCBI la variación no afecta la proteína, pues es de tipo sinónima y en consecuencia se mantiene el aminoácido serina (NP_000123.1:p.Ser1288=) (Figura 7). Lo anterior indica que pese que los

miembros de la familia I.1, II.1 y II.2 sean mujeres heterocigotas con un alelo A y el otro C, la proteína del FVIII sigue siendo funcional.

Los alineamientos realizados con CLC Main workbench 7 demostraron la presencia de sólo dos variaciones en algunos miembros de la familia, rs1800292 y rs1050705. El polimorfismo rs1800292 fue reportado por primera vez por Lander et al. (2001).

PROVEAN Result - Full version (Download)

Database: human 37_66

Note: For each variant all protein isoforms are shown.

VARIATION		PROTEIN SEQUENCE CHANGE							
ROW_NO.	INPUT	PROTEIN_ID	LENGTH	STRAND	CODON_CHANGE	POS	RESIDUE_REF	RESIDUE_ALT	TYPE
1	X,154158201,T,G	ENSO00000353393	2351	-1	TTC TC[A/C] AAA	1288	S	S	Synonymous
2	X,154064200,C,T	record not found							

VARIATION		PROVEAN PREDICTION				SIFT PREDICTION				ANNOTATION
ROW_NO.	INPUT	SCORE	PREDICTION (Cutoff=2.5)	#SEQ	#CLUSTER	SCORE	PREDICTION (Cutoff=0.05)	MEDIAN_INFO	#SEQ	dbSNP_ID
1	X,154158201,T,G	0.000	Neutral	78	30	1.000	Tolerated	3.58	32	rs1800292
2	X,154064200,C,T									rs1050705

Figura 7. Análisis con SIFT y PROVEAN del efecto sobre la proteína de los dos polimorfismos rs1800292 y rs1050705 encontrados en la familia.

El efecto sobre la proteína también se analizó en SnpEff 3.4 en donde se ratificó el efecto sinónimo de la variación (Figura 8).

```
##SnpEffVersion="3.4i (build 2014-01-16), by Pablo Cingolani"
##SnpEffCmd="SnpEff
GRCh37.74 ../Variaciones_Hemofilia_Diana.txt "
##INFO=<ID=EFF,Number=.,Type=String,Description="Predicted
effects for this variant.Format: 'Effect ( Effect_Impact |
Functional_Class | Codon_Change | Amino_Acid_Change|
Amino_Acid_length | Gene_Name | Transcript_BioType | Gene_Coding
| Transcript_ID | Exon_Rank | Genotype_Number [ | ERRORS |
WARNINGS | )' ">
X 154158201 . T G . .
EFF=SYNONYMOUS_CODING (LOW|SILENT|tcA/tcC|S1288|2351|F8
|protein_coding|CODING|ENST00000360256|14|1)
. 1 . null . . .
. 1 . null . . .
. 1 . null . . .
```

Figura 8. Análisis del efecto de la variación rs1800292 (Posición X,154158201,T,G), en donde se evidencia que la variación es sinónima sin efecto sobre la proteína del FVIII.

La segunda variación reportada en las bases de datos fue detectada en el exón 26. Esta variación denominada rs1050705, constituye una Variación R en donde cambia una Guanina por una Adenina. En los individuos I.2 (2Ex26D) y III.1 (5Ex26D) se observó la transición de una guanina por una adenina (sustitución de purina por purina). En los demás miembros de la familia se observa un polimorfismo con la presencia de los dos alelos, A y G (Figura 9). De esta variación NCBI, SIFT, PROVEAN y SNPeffect 3.4 no cuentan con información respecto a una predicción del efecto sobre la proteína del FVIII, de ahí que en esta investigación se dé por primera vez un reporte del efecto sobre la misma. El codón con el alelo de referencia original es CUA y codifica para el aminoácido Leucina.

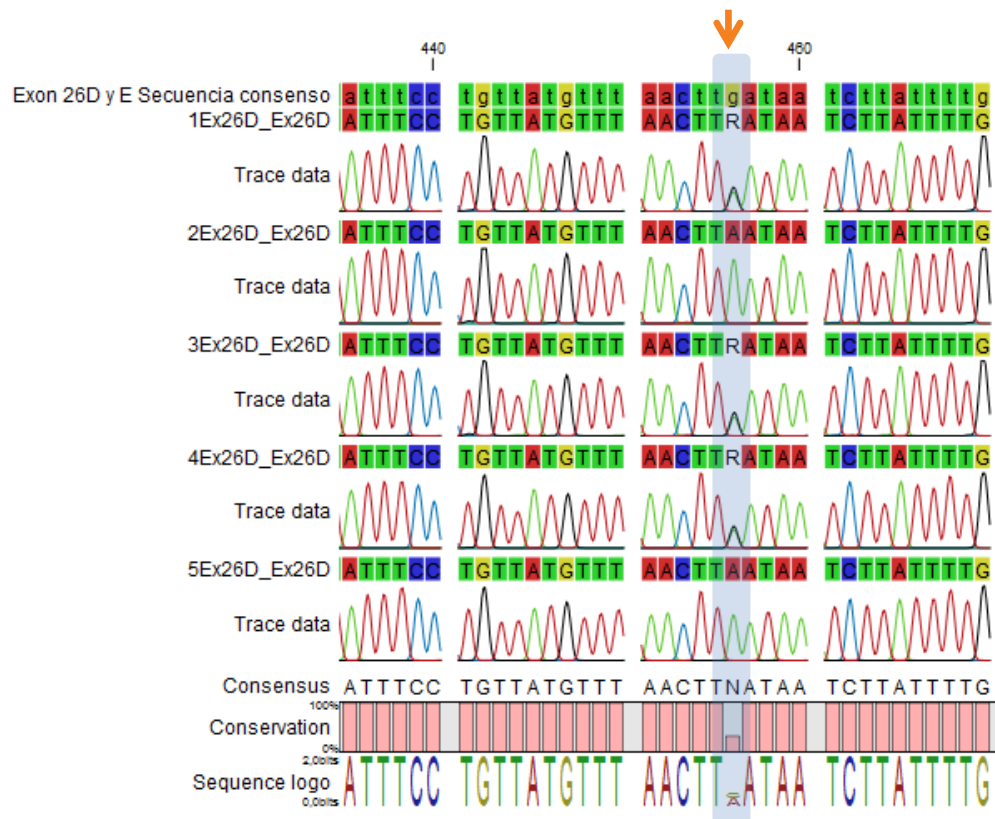


Figura 9. Polimorfismo en forma de heterocigoto en el exón 26 de los cinco miembros de la familia, variación de tipo Transición, cambio de una Guanina por una Adenina.

El codón con el alelo alternativo o mutado es UUA, lo que constituye una variación de tipo sinónima y neutral, pues se codifica también para el aminoácido Leucina. Lo anterior demostraría que tampoco esta variación tiene un efecto dañino sobre la proteína del FVIII. Los demás exones no presentaron ninguna variación en sus secuencias.

Discusión

Cuando se produce la ruptura de un vaso sanguíneo, se da una vasoconstricción local, que reduce el flujo sanguíneo a la zona dañada. Luego, las plaquetas se adhieren a la superficie vascular alterada, secretan factores agregantes y constituyen el llamado tapón plaquetario. Este tapón, aunque laxo, puede bloquear con éxito pequeñas rupturas vasculares, pero si el daño es mayor se hace necesaria la formación de un verdadero coágulo sanguíneo para detener la hemorragia. Allí es cuando intervienen los factores de la coagulación sanguínea. Ya sea por vía intrínseca o extrínseca, ambas vías confluyen en la activación del FX de la coagulación (García-Chávez 2007).

En condiciones normales, el complejo Factor tisular – Factor VIIa (FT-FVIIa) es el responsable inicial de convertir el FX en FXa, el cual proporciona suficiente trombina para inducir la agregación local de las plaquetas y activación de los cofactores FV y FVIII. Sin embargo, el FXa es amortiguado por el inhibidor del Factor Tisular (FTI), lo que lo hace insuficiente para sostener la hemostasia. Sólo la acción amplificadora del FIXa y FVIIIa sobre dicho FXa permite que persista la misma (García – Chávez et al. 2007). En el caso particular de las personas con HA ó EvW dichos mecanismos de coagulación sanguínea se ven alterados.

Al evaluar los niveles de los FVIII y FvW junto con otros valores de referencia en la familia de estudio, se pudo evidenciar un diagnóstico clínico que se mantiene en algunos pacientes, pero que en otros no está soportado con el segundo diagnóstico clínico hecho durante el presente estudio. Así por ejemplo, la mujer diagnosticada como portadora de HA (II.2) inicialmente presentaba el FVIII alterado, aunque su FvW y su TP y TPT eran normales. Los niveles de FVIII entre 28.2 y 34 la clasificaban como portadora de una Hemofilia leve, congruente con las manifestaciones clínicas de hematomas y hemorragias mucosas espontáneas. Sin embargo, tras el nuevo diagnóstico clínico se observa un nivel normal de FVIII. La mujer en mención presentó en los análisis previos niveles bajos del FVIII, que solamente se encontraron aumentados durante su embarazo. Para el caso de la mujer diagnosticada con EvW (II.1) se observó en las primeras y segundas pruebas clínicas el FVIII normal, pero continuaron alterados los niveles del FvW. Al igual que en la mujer II.2, durante el embarazo los niveles del FVIII aumentaron considerablemente, pero, el FvW permaneció bajo, contrario a lo esperado. Este fenómeno de aumento de los factores durante la gestación es normal porque en esta etapa se producen diversos cambios en el sistema hemostático en general y en el fibrinolítico en particular, que tienen como finalidad prevenir una excesiva hemorragia en el parto. Los factores vitamino-K dependientes se incrementan durante la gestación, especialmente el FVII. También aumentan el FVIII, Factor von Willebrand y sobre todo el fibrinógeno (Kadir et al. 2009).

El niño con el doble diagnóstico de Hemofilia A y enfermedad de von Willebrand (III.1), en sus primeras determinaciones de laboratorio presentó un nivel de FvW de 42,8 (valor de referencia de 60 - 150) y de FVIII de 45,7 (valor de referencia de 50 - 150). En el nuevo diagnóstico sólo se encontró alterado el FvW con un nivel de 37,8. Si el FVIII está directamente implicado en la vía

intrínseca de la coagulación y ésta es medida en el laboratorio con los TPT parcial activado (TPTA) (Kasper 2008; Giangrande 2005), era de esperarse que estos valores aparecieran un poco prolongados en los individuos II.2 y III.2; sin embargo, el leve aumento de dicho tiempo no es relevante pues se aceptan hasta 4 segundos prolongados por encima del valor de referencia. Cabe destacar que sólo se consideran críticos valores de TP mayores de 20 segundos y de TPT mayores de 70 segundos (Kitchen 2010), tiempos que no se dieron en la familia objeto de estudio. Los individuos I.1 y I.2 que previamente no habían sido analizados mostraron niveles normales de los dos factores, así como de TP y TPT.

El nuevo diagnóstico clínico basado en los resultados de laboratorio y en la apreciación de los hematólogos de las diferentes EPS de los individuos, mostró en la familia de estudio un caso más de EvW, en donde se desvirtúa el doble diagnóstico preliminar. Pero para descartar la presencia de HA a nivel genético se buscó primero detectar las inversiones en los intrones 1 y 22. De acuerdo con los resultados la familia no presenta la Inversión 1, que ha sido reportada en el 5% de los pacientes con HA severa (Poggi et al. 2011). Esto es congruente con las manifestaciones clínicas en la familia, pues ninguno de sus miembros presenta un fenotipo severo con hemorragias espontáneas en articulaciones y músculos.

Para el caso de la inversión 22, todos los individuos estudiados presentaron en las electroforesis banda en los carriles 1 y 3 que no permiten saber si se trata de personas hemofílicas, portadoras o sanas. Según Poggi, la inversión 22 es un producto de una recombinación homóloga entre la región intrónica y las regiones cercanas al telómero, lo que produce la traslocación de los exones 1 al 22 a la región cercana al telómero en forma invertida (Poggi et al. 2011). Se cree que el gen

distal, mas telomérico, sería más inestable y proclive a la recombinación homóloga o que en las regiones adyacentes existirían secuencias que facilitarían el mecanismo de recombinación. Esto genera ausencia completa de expresión del factor VIII y un fenotipo severo, que no es el caso de la familia estudiada. Es más, en los reportes existentes hasta el momento en la literatura no se evidencia ningún caso de inversión del intrón 22 en pacientes con fenotipo moderado o leve. Los pacientes con dicha inversión no pueden sintetizar un factor VIII funcional dado que el gen está partido en dos y orientado en direcciones opuestas, por lo tanto es de esperar que todos los pacientes que presenten la inversión expresen un fenotipo grave (Tizzano 1996).

Para identificar posibles variaciones en el resto del gen que tuvieran algún efecto en el fenotipo y confirmaran la presencia de HA, se hizo secuenciación de los diferentes exones. El tipo de mutación que se puede encontrar con esta técnica permite predecir la severidad de la enfermedad, en especial en los casos esporádicos o sin antecedentes familiares que corresponden a cerca de un tercio de los pacientes. La secuenciación permite conocer también portadoras, una de las aplicaciones más importantes del análisis del gen del FVIII, a quienes se les podría brindar consejo genético por parte de personal especializado o en quienes se podría conocer la presencia de alelos con mutaciones en el gen del FVIII, así tengan niveles normales de actividad del factor VIII y no sean detectadas dichas variaciones (Poggi et al. 2011).

Los alineamientos realizados con CLC Main workbench 7 demostraron la presencia de sólo dos variaciones en algunos miembros de la familia, rs1800292 y rs1050705. El polimorfismo rs1800292 fue reportado por primera vez por Lander et al. (2001). Esta variación se encuentra en el exón 14 y es el resultado de un cambio de una Adenina por una Citosina, variación de tipo

transversión; es decir, hay un cambio de una purina por una pirimidina (NG_011403.1:g.97798A>C).

De acuerdo con las frecuencias de los alelos de referencia y alterno en los gráficos de población, el alelo ancestral o de referencia adenina (A) podría provenir del noroccidente de Europa (0=0,261; A=0,717; C=0,022), y haber entrado con los eventos de colonización o migración a América. La variación rs1800292 que describe el cambio del codón AGU por AGC pudo haber aparecido inicialmente en población Emory; es decir, afroamericanos o caucásico-americanos donde la fijación del alelo C es total, pese a ser una transversión, mutaciones menos probables que las transiciones (C= 1,0). La población que por esencia ha sido heterocigota, presentando los dos alelos es la GAIT, correspondiente a españoles caucásicos, lo que demostraría la posible ancestría de la familia por linaje materno con dicha población (Figura 10).

Sample Ascertainment				Genotype Detail							Alleles		
Population	Individual Group	Chrom. Sample Cnt.	Source	0/A	0/C	A/A	A/C	C	C/C	HWP	0	A	C
PGA-AFRICAN-PANEL	African American	48	IG	0.458	0.042	0.458	0.042			0.497	0.250	0.708	0.042
PGA-EUROPEAN-PANEL	European	46	IG	0.522		0.435	0.043			0.449	0.261	0.717	0.022
IESP_Cohort_Populations		4292	GF			0.869	0.099		0.032	0.001		0.919	0.081
AGI_ASP_population	multiple	78	IG			0.744	0.256			0.655		0.872	0.128
GAIT		16	IG			1.000						0.500	0.500
Conell	Asian	13	IG			0.857	0.143					0.462	0.538
Emory		2	IG					1.000					1.000
HSP_GENO_PANEL		118	IG	0.220	0.068	0.407	0.254		0.051	0.819	0.144	0.644	0.212
YRI_GENO_PANEL	Sub-Saharan African	120	IG	0.450	0.050	0.433	0.067			0.250	0.250	0.692	0.058
AAM_GENO_PANEL	African American	124	IG	0.048	0.016	0.774	0.161			0.549	0.032	0.879	0.089
CEU_GENO_PANEL	European	120	IG	0.417	0.083	0.417	0.083			0.150	0.250	0.667	0.083
CHB_GENO_PANEL	Asian	90	IG	0.444	0.044	0.400	0.111			0.368	0.244	0.678	0.078
JPT_GENO_PANEL	Asian	90	IG	0.467	0.022	0.489	0.022			0.333	0.244	0.733	0.022

Figura 10. Frecuencia de los alelos de referencia y alterno en poblaciones reportadas en NCBI para la variación rs1800292. Se evidencia posible ancestría de la familia con población española caucásica.

La variación rs1050705 en el exón 26, por su parte, es el resultado de un cambio de una Guanina por una Adenina (NG_011403.1:g.191799G>A). Extrapolando dicha información a los gráficos de población, se evidenció que sólo la población Emory; es decir, afroamericanos o caucásico-americanos poseen el alelo de referencia o ancestral G con una fijación igual 1,0. En las demás poblaciones el alelo alterno o mutado se encuentra más frecuentemente, incluso sin evidencia del alelo ancestral, lo que implicaría que dicha mutación no es rara, pues desde tiempo atrás, se ha fijado en las diferentes poblaciones, como en el caso de los Yorubas en Ibadan, Nigeria (YRI), europeos (ENSEMBL Venter y ENSEMBL Watson) y caucásicos (PGP), entre otras (Figura 11). Sólo la población GAIT, españoles caucásicos, presenta desde el inicio la condición heterocigota de A/G (0,488/0,512), tal como se observó en las mujeres de la familia (Figura 9, individuos I.1: Secuencia 1EX26D, II.1: 4EX26D y II.2 3EX26D), de ahí que la variación se vea en el alineamiento con el programa CLC Main workbench 7 como una variación R. Lo anterior es el resultado de la doble carga cromosómica del X en las mujeres, contrario a la única carga en los hombres que no permite observar heterocigotos, sino de una vez sustituciones cuando hay una variación. Esto se observó en los dos hombres de la familia objeto de estudio, en quienes es claro el cambio de Guanina por Adenina (Figura 9, individuos I.2: Secuencia 2EX26D y III.1: 5EX26D). Los datos de esta segunda variación evidencian nuevamente una posible ancestría de la familia con población española caucásica la cual sería interesante comprobar con análisis de marcadores informativos de ancestría (AIM).

Sample Ascertainment				Genotype Detail								Alleles		
Population	Individual Group	Chrom. Sample Cnt.	Source	0/A	0/G	A	A/A	A/G	G	G/G	HWP	0	A	G
YRI		2	IG				1.000							1.000
ENSEMBL_Venter		2	IG				1.000							1.000
ENSEMBL_Watson		2	IG				1.000							1.000
PGP		1	IG				1.000							1.000
CEPH		184	AF										0.810	0.190
BUSHMAN_POP2		1	IG				1.000							1.000
AFD_EUR_PANEL	European	48	IG	0.391	0.174		0.304	0.130			0.273	0.283	0.568	0.152
AFD_AFR_PANEL	African American	48	IG	0.087	0.391		0.043	0.174		0.304	0.549	0.239	0.174	0.587
AFD_CHN_PANEL	Asian	48	IG				0.809	0.217		0.174	0.050		0.717	0.283
TSC_42_AA		84	AF										0.350	0.650
TSC_42_C		84	AF										0.850	0.150
TSC_42_A		84	AF										0.900	0.100
PGA-AFRICAN-PANEL	African American	48	IG	0.125	0.375		0.042	0.187		0.292	0.549	0.250	0.188	0.582
PGA-EUROPEAN-PANEL	European	44	IG	0.364	0.182		0.318	0.136			0.273	0.273	0.568	0.159
GAIT		43	IG				0.955	0.045			0.005		0.488	0.512
Coriell	Asian	34	IG				0.444	0.111		0.444	0.343		0.235	0.765
Emory		7	IG				1.000							1.000
HapMap-CEU	European	226	IG				0.890	0.150		0.159	0.001		0.765	0.235
HapMap-HCB	Asian	86	IG				0.791	0.093		0.116	0.001		0.837	0.163
HapMap-JPT	Asian	172	IG				0.837	0.105		0.058	0.001		0.890	0.110
HapMap-YRI	Sub-Saharan African	224	IG				0.018	0.045		0.938	0.001		0.040	0.960
HAPMAP-ASW		98	IG				0.122	0.285		0.612	0.050		0.258	0.745
HAPMAP-CHB	Asian	82	IG				0.732	0.220		0.049	0.273		0.841	0.159
HAPMAP-CHD		170	IG				0.778	0.094		0.129	0.001		0.824	0.176
HAPMAP-GIH		176	IG				0.500	0.250		0.250	0.001		0.625	0.375
HAPMAP-LWK		180	IG				0.044	0.211		0.744	0.150		0.150	0.850
HAPMAP-MEX		100	IG				0.500	0.280		0.220	0.010		0.640	0.360
HAPMAP-MIKK		286	IG				0.245	0.196		0.559	0.001		0.343	0.657
HAPMAP-TSI		174	IG				0.713	0.138		0.149	0.001		0.782	0.218

Figura 11. Frecuencia de los alelos de referencia y alternativo en poblaciones reportadas en NCBI para la variación rs1050705. Se evidencia nuevamente posible ancestría de la familia con población española caucásica.

De acuerdo con esto, podría suponerse que tanto el alelo de referencia como el mutado se encuentran fijados desde hace muchas generaciones en alguna parte de la población colombiana;

por tanto, no se puede asegurar que la mutación tenga linaje materno o paterno en la familia objeto de estudio ni que haya mutaciones espontáneas en las células germinales de los parentales.

Los resultados del diagnóstico genético demostraron que la familia estudiada no presenta variaciones que afecten la proteína del FVIII; por tanto, se desvirtuó el doble diagnóstico clínico y la presencia de Hemofilia en ella desde un punto de vista netamente genético. La nueva genealogía de la familia propuesta a partir de este estudio (Figura 12), contempla solamente la EvW. Pese a que los nuevos resultados de laboratorio respecto a los niveles del FvW sólo mostraron alteración en los individuos II.1 y III.1 (madre e hijo), es muy probable que las mujeres I.1 y II.2 tengan también la enfermedad y por eso se proponen en el nuevo diagnóstico como personas con sospecha, teniendo en cuenta la sintomatología que han presentado a lo largo de su vida.

Adicionalmente, es importante tener en cuenta que un factor ambiental que puede afectar los niveles del FvW y del FVIII es el estrés. Así, los niveles plasmáticos de FvW y FVIII aumentan entre dos y cinco veces durante el estrés fisiológico o el ejercicio. Algunos autores consideran que las hormonas tiroideas, epinefrina, estrógeno y progesterona son todas sustancias que incrementan los niveles de FvW. También varían durante el ciclo menstrual, la toma de anticonceptivos orales y el embarazo, como se mencionó anteriormente (Robertson et al. 2008). Dichos factores ambientales deben contemplarse como factores importantes en la detección de la EvW en toda la familia.

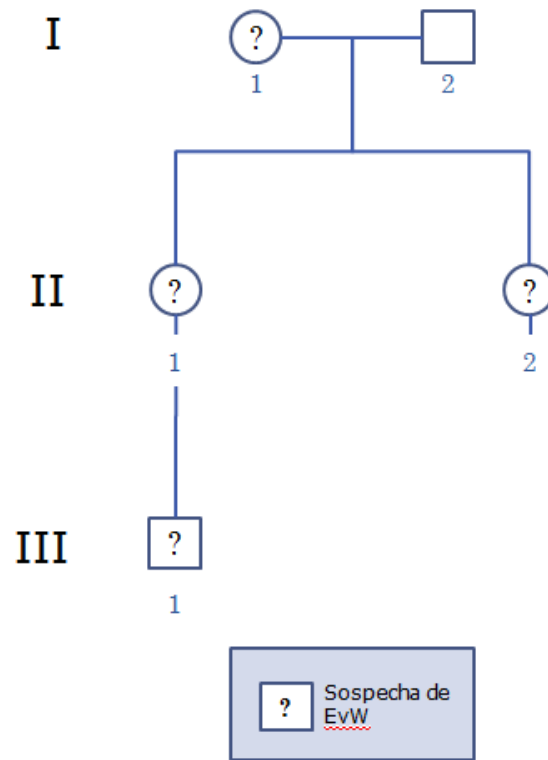


Figura 12. Nueva genealogía propuesta a partir del diagnóstico clínico, refutando la presencia de HA en la familia objeto de estudio.

Como el problema de investigación planteaba la presencia de las dos enfermedades, se pensó en estudiar una de ellas con el propósito de comprobarla o descartarla a nivel molecular. La EvW no se analizó a nivel genético debido a que el gen del FvW es altamente polimórfico lo que complica su análisis genético (Keeney et al. 2008) y muy extenso, con un tamaño de 178Kb y 52 exones (Goodeve 2005). En la actualidad se carece de la suficiente información para lograr secuenciarlo, de ahí que se abordaran las dos enfermedades clínicamente, pero sólo la HA a nivel genético.

Es importante resaltar que de acuerdo con los resultados de laboratorio iniciales que tenía la familia y tras varios años de contar con el doble diagnóstico, hay un claro problema de

diagnóstico clínico de las dos coagulopatías estudiadas y de calidad en las prácticas médicas, pues no todos los laboratorios tienen en cuenta los mismos valores de referencia y aplican las mismas pruebas para identificar la presencia o no de cierta enfermedad. Incluso ciertas pruebas no están cobijadas en el régimen de salud y por tanto los médicos tienen que basar su diagnóstico en las permitidas. Con base en lo anterior, es probable que en estudios de laboratorio anteriores, los individuos II.2 y III.1 hayan sido diagnosticados con niveles de FVIII disminuidos cuando el factor que realmente estaba alterado era el FvW. De hecho, el gran problema que se presenta en esta familia es que los individuos no tienen los estudios completos que de verdad se requieren para descartar desde un punto de vista clínico las dos coagulopatías, como por ejemplo, el cofactor de Ristocetina, agregación plaquetaria, microscopía electrónica plaquetaria, factor XIII, retracción del coágulo y el tiempo de trombina (TT) (Kitchen et al. 2010).

Se sabe de antemano que el FVIII se asocia con el FvW para que lo estabilice al unirse al dominio B y al N- terminal del dominio A3 del FVIII. El FvW evita la unión de una superficie fosfolipídica al FVIII, superficie que la proteína C activada (PCA) necesita para poder degradarlo (Fay et al. 1991). El FvW se encuentra tan estrechamente relacionado al FVIII que cuando se purifica éste último del plasma, se copurifica también el FvW y constituye casi el 95% del total de la proteína contenida. De hecho, el FVIII es un rastro en el plasma con una concentración de sólo 0.2 mg/L (Fulcher et al. 1982). Esto concordaría con la posibilidad de que la familia clínicamente hablando, posea EvW tipo 1 ó 2N, en la cual FvW no se une al FVIII y al no unirse éste último no es estable y se degrada en el plasma por la proteína C activada. Al hacer el análisis del factor se asume que el FVIII no es funcional y se da el diagnóstico equivocado de HA, (Mazurier et al. 1990), teniendo en cuenta los resultados arrojados por este estudio desde el punto

de vista genético, situación que probablemente ocurrió con los individuos II.2 y III.1 de la familia. Se asume que la familia objeto de estudio podría tener EvW tipo 1 o 2N porque en los dos tipos se consideran disminuciones de los niveles del FvW y FVIII; sin embargo, la tipo I que se hereda como un rasgo dominante, se diagnostica cuando son deficiencias cuantitativas parciales de los factores; mientras que la 2N o Normandía, un rasgo poco frecuente recesivo, es una deficiencia cualitativa que afecta la función de proteína del FvW (Kitchen et al. 2010). Se descarta la EvW tipo 3 en la familia pues ésta consiste en la ausencia virtual de la proteína del FvW y tiende a generar un fenotipo severo (Robertson et al. 2008).

Saber específicamente si la familia presenta una EvW de tipo 1 o 2N depende de una serie de análisis de laboratorio más exhaustivos, que incluyan medidas cualitativas y cuantitativas del FvW y del FVIII. Entre algunas pruebas especializadas para confirmar la EvW como las mencionadas anteriormente, estarían las pruebas de agregación plaquetaria con diferentes agentes agregantes como Ristocetina y colágeno. La prueba de actividad del Cofactor de Ristocetina en plasma puede determinarse a través de la aglutinación de una suspensión estandarizada de plaquetas en presencia del FvW utilizando el antibiótico ristocetina. La EvW está asociada a una reducción de la actividad del cofactor de la ristocetina y de forma generalizada se acepta que dicha prueba es el ensayo *in vitro* más útil para diagnosticar la EvW (CLSI 2008). Los análisis biológicos y clínicos deberán ir acompañados de un diagnóstico genético que permita comprobar mutaciones en el gen del FvW, lo que abriría la puerta a investigaciones futuras.

Referencias

Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. 2002. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor III gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood*. Jan 1;99(1):168-74.

Bermeo S, Silva-Tamar C, Fonseca, J, Restrepo, CM. 2007. Hemofilia: diagnóstico molecular y alternativas de tratamiento. *Colomb. Med.* v.38 n.3 Cali jul./sep.

Bowen, DJ. 2002. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *J Clin Pathol: Mol Pathol*;55:127-144

Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. (2012) Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS ONE* 7(10): e46688.

Colhemofílicos. 2014. Pasado, presente y futuro de la Hemofilia. Liga Colombiana de Hemofílicos y otras deficiencias sanguíneas.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline - Fifth Edition. CLSI document H21-A5 Vol. 28, No. 5.

Devlin TM. 2006. Bioquímica. Editorial Reverté. Cuarta Edición. Barcelona, España.

Fay PJ, Coumans J-V, Walker FJ. 1991. Von Willebrand factor mediates protection of factor VIII from activated protein C- catalyzed inactivation. *J Biol Chem* 266, 2172-2177

Fulcher CA, Zimmermann TS. 1982. Characterization of the human factor VIII procoagulant protein with a heterologous precipitating antibody. *Proc Natl Acad Sci* 79, 1648-1652.

Gaaib J N, Nassief A F, Al-Assi A H. 2011. Simple salting – out method for genomic DNA extraction from whole Blood. *Tikrit Journal of Pure Science* 16 (2). ISSN: 1813 – 1662.

Ganguly, A, Rock, MJ, Prockop, DJ. 1993. Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 November 1; 90(21): 10325–10329. PMCID: PMC47767

Garcés-Gutiérrez, MF. 2012. Estudio molecular de la inversión de los intrones 1 y 22 del FVIII de la coagulación en un grupo de pacientes pediátricos Colombianos con diagnóstico de HA. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia.

García-Chávez J, Carrillo-Esper R, Majluf-Cruz A. 2007. Fisiología del sistema de coagulación. *Gac Méd Méx* Vol. 143 Supl 1.

Giangrande P. 2005. Hemofilia adquirida. World Federation of Hemophilia. Tratamiento de la hemofilia. Diciembre No. 38. Montréal, Québec, Canadá.

Goodeve A. 2005. Genotypic classification of von Willebrand disease. *Haematologica reports*;1(4):16-19.

Graw J, Brackmann HH, Oldenburg J, Schneppenheim R, Spannagl M, Schwaab R. Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. 2005. *Nat Rev Genet*. Jun;6(6):488-501.

Jiménez Moles E, Ortiza Callejón MA, Béjar Pretel F. 2012. Enfermedad de von Willebrand y su diagnóstico en el laboratorio. Tomado de libroslaboratorio.wordpress.com

Kadir RA, James AH. 2009. Salud reproductiva en mujeres con trastornos de la coagulación. World Federation of Hemophilia. Tratamiento de la hemofilia. Octubre de 2009 no 48. Montréal, Québec, Canadá.

Kasper C. 2008. Trastornos hereditarios de los factores de coagulación plasmáticos y su manejo. Federación Mundial de la Hemofilia. (FMH). Quinta Edición. Tratamiento de la Hemofilia. No. 4. Abril.

Keeney S, Bowen D, Cumming A, Enayat S, Goodeve A, Hill M. 2008. The Molecular Analysis of von Willebrand Disease: a Guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organisation Haemophilia Genetics Laboratory Network. UK Haemophilia Centre Doctors' Organisation (UKHCDO).

Kitchen S, McCraw A, Echenagucia, M. 2010. Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación: Manual de laboratorio. Segunda edición. Federación Mundial de Hemofilia. Québec, CANADÁ

Koedam JA, Hamer RJ, Beeser-Visser NH, Bouma BN, Sixma JJ. 1990. The effect of von Willebrand factor on activation of factor VIII by factor Xa. *Eur J Biochem* 189, 229-234.

Körkkö, Jarmo, Annunen, Susanna, Pihlajamaa, Tero, Prockop, Darwin J. y Ala-Kokko, Leena. 1998. Conformation sensitive gel electrophoresis for simple and accurate detection of mutations: Comparison with denaturing gradient gel electrophoresis and nucleotide sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 February 17; 95(4): 1681–1685. PMID: 9419147

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. Feb 15;409(6822):860-921.

Leiria LB, Roisenberg I, Salzano FM, Bandinelli E. 2009. Introns 1 and 22 inversions and factor VIII inhibitors in patients with severe haemophilia A in southern Brazil. *Haemophilia*. Jan;15(1):309-13.

Lillicrap, D. 2008. Ciencia básica, diagnóstico y tratamiento médico de la EvW. Federación Mundial de la Hemofilia. (FMH). Abril. No 35. Ontario, Canadá.

Liu Q, Nozari G, Sommer SS. 1998. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A. *Blood*. Aug 15;92(4):1458-9.

Mannucci P. 2002. Hemophilia and related bleeding disorders: A story of dismay and success. *Hematology* 1: 1-9. doi: 10.1182

Mantilla-Capacho, J. et al. 2005. Diagnóstico molecular en pacientes y portadoras de HA y B. *Gac Méd Méx* Vol. 141 No. 1.

Manzini, JL. 2000. Declaración de Helsinki: Principios éticos para la investigación médica sobre sujetos humanos. *Acta Bioética*; año VI, n° 2.

Martínez – Murillo C. 2006. Mecanismos de activación de la coagulación. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2006; 44 (Supl 2): 51-58

Mazurier C, Dieval J, Jorieux S, Delobel J, Goudemand M. 1990. A new von Willebrand factor (vWF) defect in a patient with factor VIII (FVIII) deficiency but with normal levels and multimeric patterns of both plasma and platelet vWF: Characterization of abnormal vWF/FVIII interaction. *Blood* 75, 20-26.

Poggi H, Honorato J, Romeo E, Zuñiga P, Quiroga T, Lagos M. 2011. Análisis de las inversiones del intrón 1 y 22 y secuenciación del gen F8 para el diagnóstico genético-molecular de hemofilia A en Chile. *Rev Med Chile*; 139: 189-196

Poláková H, Zmetáková I, Kádasi L. 2003. Long distance PCR in detection of inversion mutations of F8C gene in hemophilia A patients. *Gen Physiol Biophys.* Jun;22(2):243-53.

Radic, CP. 2010. Genética molecular de hemofilia: caracterización de mutaciones en hemofilia B, expresión de hemofilia en mujeres y desarrollo de nuevos métodos de análisis de inversiones. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Rick M, Walsh C, Key N. 2003. Congenital bleeding disorders. *Hematology.* ASH Education Book January 1, 2003 vol. 2003 no. 1 559-574. doi: 10.1182

Robertson J, Lillicrap D, James PD. 2008. Enfermedad de Von Willebrand. *Pediatr Clin N Am* 55; 377–392.

Rodak BF. 2005. Hematología. Fundamentos y Aplicaciones Clínicas. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

Rodríguez – Martorell FJ, Míngoor ME, Palomo A, Nuñez R, Pérez – Garrido R, Villar A, Tizzano EF, Alonso C, Altisent C, Aznar JA, Batlle J, Bermejo N, Blázquez A, Galmes B, García- Frade LJ, Iruín G, López-Cabarcos C, Lucía JF, Moreno M, Sedano C, Simón MA, Soriano V, Turnés J, Liras A. 2009. Recomendaciones sobre Portadoras en Hemofilia. Real Fundación Victoria Eugenia y Federación Española de Hemofilia.

Shen BW, Spiegel PC, Chang CH, Huh JW, Lee JS, Kim J, Kim YH and Stoddard BL. 2008. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. *Blood* 111: 1240-1247. doi:10.1182/blood-2007-08-109918.

Spronk H, Govers-Riemslog J, Cate H. 2003. The blood coagulation system as a molecular machine. *Bioessays* 25: 1220-1228. DOI: 10.1002/bies.10360

Tizzano EF. 1996. Las bases moleculares de la hemofilia A. En: Méndez Felpeto J. 1996. La genética molecular en el diagnóstico de las patologías humanas: estrategias y tecnologías. A Coruña: Universidade, p. 39-48. ISBN: 84-88301-48-0

Williams IJ, Abuzenadah A, Winship PR, Preston FE, Dolan G, Wright J, Peake IR, Goodeve AC. 1998. Precise carrier diagnosis in families with haemophilia A: use of conformation sensitive gel electrophoresis for mutation screening and polymorphism analysis. *Thromb Haemost.* 1998 Apr;79(4):723-6. PMID: 9569180

WFH. 2012. Report on the ANNUAL GLOBAL SURVEY 2012. World Federation of Hemophilia.

ANEXO 2. Datos clínicos resumidos y detallados previos al estudio de la familia. En naranja se muestran los resultados alterados. Las fechas con asterisco indican condición especial de embarazo.

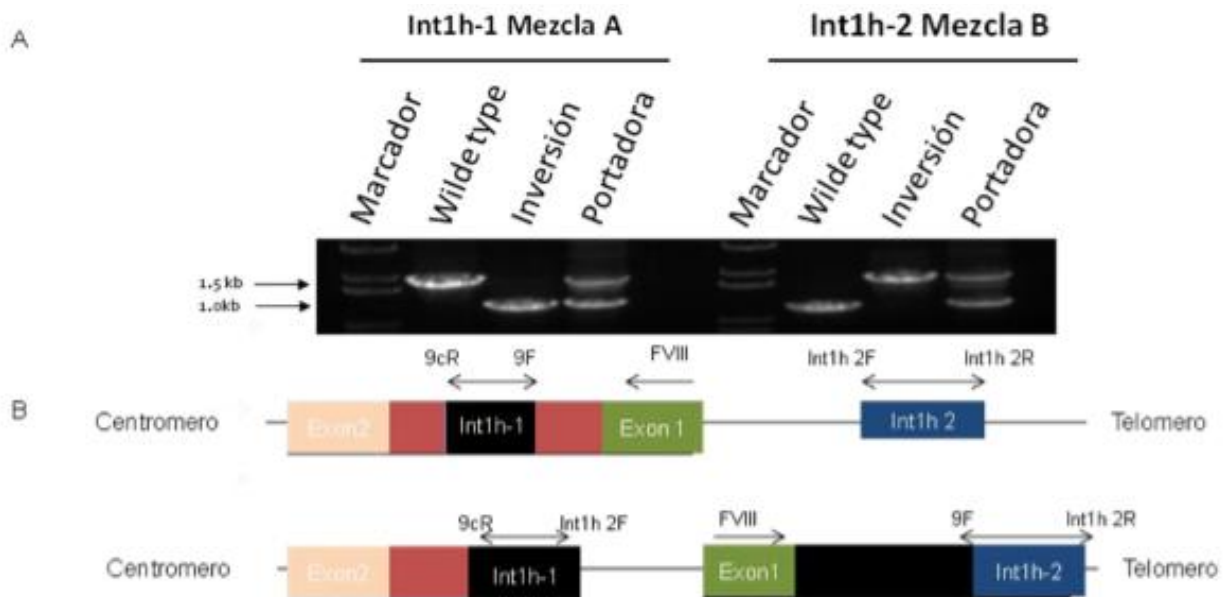
INDIVIDUO	FECHA DE EXAMEN	FvW	FVIII
	Valores de Referencia	60-150	50-150
II.1 Mujer con EvW	Marzo de 2002	31	Normal
	Diciembre 15 de 2006	45,9	Normal
	Agosto 2 de 2007*	91,2	231,4
	Enero 9 de 2008	51,1	60,3
	Julio 31 de 2012	43	57,4
III.1 Niño con HA y EvW	Diciembre 2 de 2008	42,8	45,7
	Valores de Referencia	52-154	50-150
II.2 Mujer portadora de HA	Marzo 17 de 2011	74,21	28,2
	Junio 20 de 2011*	101,49	105
	Agosto 12 de 2011*	105,12	115
	Junio 7 de 2012	Normal	34

Individuo	Fecha de examen	Factor de von Willebrand	Factor VIII	PT	PTT	Condición
II.1 Mujer con EvW	Marzo de 2002	31	Normal			
	Valores de Referencia	60-150	50-150			
	Diciembre 15 de 2006	45,9	Normal	11,7 s.	33,2 s.	Tres semanas de Embarazo
	Valores de Referencia	60-150	50-150	10,9 s.	27 s.	
	Agosto 2 de 2007	91,2	231,4			Ocho meses de Embarazo
	Valores de Referencia	60-150	50-150			
	Enero 9 de 2008	51,1	60,3	12 s.	28 s.	Cinco meses post-parto
	Valores de Referencia	60-150	50-150	10,9 s.	27 s.	
	Julio 31 de 2012	43	57,4	13,4 s.	31,9 s.	
Valores de Referencia	60-150	50-150	14,1 s.	30,1 s.		
III.1 Niño con HA y EvW	Diciembre 2 de 2008	42,8	45,7			4 meses de nacido
	Valores de Referencia	60-150	50-150			
II.2 Mujer portadora de HA	Marzo 17 de 2011	74,21	28,2	11,4 s.	27,3 s.	3 meses de Embarazo
	Valores de Referencia	52-154	50-150	12,1 s.	25,4 s.	
	Junio 20 de 2011	101,49	105	11,2 s.	25,4 s.	6 meses de Embarazo
	Valores de Referencia	52-154	50-150	11,3 s.	25,5 s.	
	Agosto 12 de 2011	105,12	115			8 meses de Embarazo
	Valores de Referencia	52-154	50-150			
	Junio 7 de 2012	Normal	34			
Valores de Referencia	52-154	50-150				

ANEXO 3. Esquematización gráfica de la técnica LD PCR para la detección de la INV 1. A.

Patrón de bandas en el gel de agarosa, según la mezcla de primers en cada caso. B.

Representación gráfica de la técnica LD PCR en donde se muestra la ubicación del juego de primers en la detección y amplificación de las regiones int1h-1 e int1h-2. (Garcés 2012).



ANEXO 4. Juego de primers para la secuenciación de los exones del gen del FVIII. Tomada de

<http://hadb.org.uk/WebPages/Database/Methods/keeneyprimers.doc>.

Primer set	Primer sequences (N13 F & R standard tails are in italics)	Product size (bp) size inc. Tails
F8P2F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> GAGCTCACCATGGCTACATTC	561
F8P2R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> AATTTAAACTATAAAGCGAGTCCTG	595
F8P1F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> GGACCTAGGCCATGGTAAAGA	600
F8P1R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> TGCAGAGCATTTTAAGGAACTTT	634
F8EX1F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TAGCAGCCTCCCTTTTGCTA	480
F8EX1R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> CTAACCCGATGTCTGCACCT	514
F8EX2F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> CATTACTTCCAGCTGCTTTTTG	290
F8EX2R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> TTTGGCAGCTGCACTTTTTA	333
F8EX3F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> GCATGCTTCTCCACTGTGAC	299
F8EX3R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> GCCACCATTACAAAGCACAC	324
F8EX4F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> CATGTTTCTTTGAGTGTACAGTGG	372
F8EX4R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> TTCAGGTGAAGGAACACAAATG	406
F8EX5F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TCTCCTCCTAGTGACAATTTCC	259
F8EX5R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> CCCATCTCCTTCATTCTGA	293
F8EX6F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> GCGGTCATTCATGAGACACA	258
F8EX6R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> CCGAGCTGTTTGTGAACTGA	292
F8EX7F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TGTCCTAGCAAGTGTTTTCCATT	400
F8EX7R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> AATGTCCCCTTCAGCAACAC	434
F8EX8F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> CACCATGCTTCCCATATAGC	484
F8EX8R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> ATGGCTTCAGGATTTGTTGG	518
F8EX9F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TTTGAGCCTACCTAGAATTTTCTTC	300
F8EX9R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> GGTATTTTAGAACTCAAACCTCTCC	334
F8EX10F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TTCTTGTTGATCCTAGTCGTTTT	250
F8EX10R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> GCTGGAGAAAGGACCAACATA	284
F8EX11F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> CCCTTGCAACAACAACATGA	362
F8EX11R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> TTTCTTCAGGTTATAAGGGGACA	396
F8EX12F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TGCTAGCTCCTACCTGACAACA	298
F8EX12R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> CATTCATTATCTGGACATCACTTTG	332
F8EX13F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> CATGACAATCACAATCCAAAATA	364
F8EX13R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> CATGTGAGCTAGTGGGCAA	398
F8EX14AF	<i>gtagcgcgacggccagt</i> CTGGGAATGGGAGAGAACCT	567
F8EX14AR	<i>cagggcgcagcgatgac</i> ATGTCCCCTGTGATGGAG	601
F8EX14BF	<i>gtagcgcgacggccagt</i> GATCCATCACCTGGAGCAAT	599
F8EX14BR	<i>cagggcgcagcgatgac</i> GGGCCATCAATGTGAGTCTT	633
F8EX14CF	<i>gtagcgcgacggccagt</i> AGCTCATGGACCTGCTTTGT	695
F8EX14CR	<i>cagggcgcagcgatgac</i> CATTCTCTTGGATTAATGTTTCCTT	729
F8EX14DF	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TCCAAGCAGCAGAAACCTATT	595

F8EX14DR	<i>cagggcgacgcgatgac</i> AGTAATGGCCCCTTTCTCCT	624
F8EX14EF	<i>gtagcgcgacggccagt</i> GGATGACACCTCAACCCAGT	570
F8EX14ER	<i>cagggcgacgcgatgac</i> CCTTCCACGAGATCCAGATG	604
F8EX14FF	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TCCCTACGGAACTAGCAATG	686
F8EX14FR	<i>cagggcgacgcgatgac</i> TCACAAGAGCAGAGCAAAGG	720
F8EX15F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TGAGGCATTTCTACCCACTTG	299
F8EX15R	<i>cagggcgacgcgatgac</i> CCAAAAGTGGGAATACATTATAGTCA	333
F8EX16F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> CAGCATCCATCTTCTGTACCA	468
F8EX16R	<i>cagggcgacgcgatgac</i> AAAGCTTCTTATTGCACGTAGG	502
F8EX17F	<i>gtagcgcgacggccagtc</i> AGGTTGGACTGGCATAAAAA	397
F8EX17R	<i>cagggcgacgcgatgac</i> CCCTGGATCAAGTCTCATTG	431
F8EX18F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TGGTGGAGTGGAGAGAAAGAA	362
F8EX18R	<i>cagggcgacgcgatgac</i> AGCATGGAGCTTGTCTGCTT	396
F8EX19F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> AACCAATGTATCTCATGCTCATTTT	248
F8EX19R	<i>cagggcgacgcgatgac</i> GGAAGAAAGCTGTAAAGAAGTAGGC	282
F8EX20F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TTTGAGAAGCTGAATTTTGTGC	228
F8EX20R	<i>cagggcgacgcgatgac</i> GAAGCATGGAGATGGATTCATTA	262
F8EX21F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> CCACAGCTTAGATTAACCTTTCTCA	261
F8EX21R	<i>cagggcgacgcgatgac</i> TGAGCTTGCAAGAGGAATAAGTAA	295
F8EX22F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TCAGGAGGTAGCACATACAT	287
F8EX22R	<i>cagggcgacgcgatgac</i> GTCCAATATCTGAAATCTGC	321
F8EX23F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TTGACAGAAATTGCTTTTTACTCTG	294
F8EX23R	<i>cagggcgacgcgatgac</i> TCCCCAGTCTCAGGATAACT	328
F8EX24F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> ACTGAGGCTGAAGCATGTCC	250
F8EX24R	<i>cagggcgacgcgatgac</i> CCCAACCACTGCTCTGAGTC	284
F8EX25F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TGGGAATTTCTGGGAGTAAATG	300
F8EX25R	<i>cagggcgacgcgatgac</i> AAGCTCTAGGAGAGGTGGTATTTTT	334
F8EX26AF	<i>gtagcgcgacggccagt</i> CTGTGCTTTGCAGTGACCAT	557
F8EX26AR	<i>cagggcgacgcgatgac</i> TTCTACAACAGAGGAAGTGGTGA	591
F8EX26BF	<i>gtagcgcgacggccagt</i> GGAGAAACCTGCATGAAAGC	596
F8EX26BR	<i>cagggcgacgcgatgac</i> TTGGCCATCACAAATTTCAA	630
F8EX26CF	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TGCAAATGTGCATTTTTCTGA	580
F8EX26CR	<i>cagggcgacgcgatgac</i> CCTCCAGCCCCCTTACTAT	614
F8EX26DF	<i>gtagcgcgacggccagt</i> CCACCCCCATAAGATTGTGA	580
F8EX26DR	<i>cagggcgacgcgatgac</i> CTGAAGAAACCAGCAGGAAAA	614
F8EX26EF	<i>gtagcgcgacggccagt</i> CCCCAAAGGTGATATGGTTTT	230
F8EX26ER	<i>cagggcgacgcgatgac</i> TCAGTGTTACATTTTTATTCCA	264

ANEXO 5. Inversión 22. Esta imagen fue tomada de Mühle C, Zenker M, Chuzhanova N, Schneider H. Hum Mutat. 2007 Oct;28(10):1045. En la figura los valores indican en tamaño de las regiones en kb, las letras P, Q, A, A2, A3 y B muestra los sitios de unión usados para la LD-PCR para la detección de la inversión relacionada con int22h. Las cajas negras representan los exones 1-22 y 23-26 del FVIII, las cajas grises indican las regiones que flanquean las copias extragénicas int22h2 e int22h3 que facilita la recombinación homóloga intergénica que da por resultado el primer evento. Los triángulos representan las secuencias Alu y L1 y su orientación. El proceso continua con la formación y estabilización del loop mediado por elementos de tipo Alu y L1, lo que permite la inserción de un fragmento externo al FVIII en este caso en el intrón 15, siendo este el segundo paso. El tercer paso lo constituye la recurrente recombinación entre las regiones int22h1 e int22h2 y el cuarto paso presumiblemente estaría compuesto por las deleción de exones del FVIII, contribuyendo a la complejidad del patrón resultante (Garcés 2012).

