



**UNIVERSIDADE DA CORUÑA**

**FACULTADE DE CIENCIAS DA SAÚDE**

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA.**

**ESPECIALIDAD EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

Curso académico 2015-16

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Estudio detallado del análisis multimérico del  
factor von Willebrand en pacientes con  
enfermedad de von Willebrand: PCM-EVW-ES**

**Ángela Rodríguez Trillo**

**Julio 2016**

**DIRECTORAS:**

**Dra. María Fernanda López Fernández**

**Dra. Almudena Pérez Rodríguez**

**TUTORA:**

**Dra. Silvia María Díaz Prado**

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE TABLAS .....	6
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS.....	7
RESUMEN .....	9
RESUMO .....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUCCIÓN .....	12
1.1 Perspectiva histórica.....	12
1.2 Factor von Willebrand.....	14
1.2.1 Biosíntesis del FVW .....	14
1.2.2 Secreción y almacenamiento del FVW.....	17
1.2.3 Funciones del FVW .....	18
1.3 La enfermedad de von Willebrand.....	18
1.3.1 Clasificación .....	19
1.3.2 Diagnóstico.....	22
2. METODOLOGÍA .....	26
2.1 Diseño del estudio .....	26
2.2 Análisis multimérico del FVW .....	27
2.3 Análisis estadístico .....	28
3. RESULTADOS.....	28
3.1 EVW Tipo 1.....	29
3.1.1 EVW Tipo 1 con patrón multimérico normal .....	29
3.1.2 EVW Tipo 1 con patrón multimérico “smear” .....	30

3.2 EVW Tipo 1 Histórico (1H).....	31
3.3 EVW Tipo 2A .....	32
3.4 EVW Tipo 2B .....	32
3.4.1 EVW Tipo 2B con patrón multimérico normal .....	32
3.4.2 EVW Tipo 2B con patrón multimérico anormal .....	33
3.5 EVW Tipo 2M.....	34
3.6 EVW Tipo 2A/2M .....	35
3.7 EVW Tipo 2N .....	35
3.8 EVW Tipo 3.....	36
3.9 Pacientes sin clasificar .....	37
3.10 Sensibilidad y especificidad.....	41
3.11 Relación entre el patrón multimérico y el BS y las razones actividad/Ag .....	41
4. DISCUSIÓN .....	45
5. CONCLUSIONES.....	47
6. AGRADECIMIENTOS .....	49
7. BIBLIOGRAFÍA .....	50
8. ANEXOS .....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol genealógico de la familia S. Föglö.....	12
Figura 2. Resumen de los cambios post-translacionales que tienen lugar durante la biosíntesis del FVW. ....	15
Figura 3. Representación esquemática de la subunidad madura del FVW y sus dominios de unión.....	16
Figura 4. Esquema del procesamiento y secreción del FVW.....	17
Figura 5. Análisis multimérico del FVW plasmático en pacientes con EVW tipo 1.....	29
Figura 6. Análisis multimérico del FVW plasmático en pacientes con EVW 1 "smeary".....	30
Figura 7. Análisis multimérico del FVW plasmático en pacientes con EVW tipo 1H.....	31
Figura 8. Análisis multimérico del FVW plasmático en pacientes con EVW tipo 2A y 2B.....	33
Figura 9. Análisis multimérico del FVW plasmático en pacientes con EVW 2M.....	34
Figura 10. Análisis multimérico del FVW plasmático en pacientes con EVW 2A/2M.....	35
Figura 11. Análisis multimérico del FVW plasmático en pacientes con EVW 2N y portadores de EVW 2N.....	36
Figura 12. Análisis multimérico del FVW plasmático en pacientes con EVW tipo 3 y portadores tipo 3 .....	37
Figura 13. Gráfica de medias de la razón FVW:RCo/FVW:Ag en función de las distintas anormalidades multiméricas.....	42
Figura 14. Gráfica de medias de la razón FVW:CB/FVW:Ag en función del patrón multimérico .....	44

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación revisada de la EVW.....	20
Tabla 2. Pruebas de laboratorio para diagnosticar la EVW.....	23
Tabla 3. Valores medios $\pm$ desviación estándar y rango de normalidad de los datos de laboratorio con patrón multimérico normal.....	39
Tabla 4. Valores medios $\pm$ desviación estándar y rango de normalidad de los datos de laboratorio con patrón multimérico anormal.....	40
Tabla 5. Cuadro sobre el estudio de la capacidad predictiva del análisis multimérico.....	41
Tabla 6. Media y desviación estándar de la razón FVW:RCo/FVW:Ag....	43
Tabla 7. Media y desviación estándar de la razón FVW:CB/FVW:Ag.....	44

## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

<b>Aa</b>	Aminoácido
<b>Ac</b>	Anticuerpo
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>ADNs</b>	Ácidos desoxirribonucleicos
<b>ATM</b>	Ausencia total de multímeros
<b>BS</b>	Puntuación hemorrágica (" <i>Bleeding Score</i> ")
<b>CTH</b>	Centros de Tratamiento de la Hemofilia (Unidades de Hemofilia)
<b>DDAVP</b>	Acetato de desmopresina
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>EVW</b>	Enfermedad de von Willebrand
<b>FVIII</b>	Factor VIII
<b>FVIII:C</b>	Factor VIII procoagulante
<b>FVW</b>	Factor von Willebrand
<b>FVW</b>	Gen del Factor von Willebrand
<b>FVW:Ag</b>	Antígeno del FVW
<b>FVW:CB</b>	Capacidad de unión del FVW al colágeno
<b>FVW:FVIII B</b>	Capacidad de unión del FVW al FVIII
<b>FVW:RCo</b>	Actividad del FVW como cofactor de la ristocetina
<b>GpIb/IX</b>	Receptor plaquetario GpIb/IX
<b>GpIIb/IIIa</b>	Receptor plaquetario GpIIb/IIIa
<b>H</b>	Hombre
<b>KDa</b>	Kilodaltons
<b>LIA</b>	<i>Latex-immuno-assay</i>
<b>LN</b>	Lisado Plaquetar normal

<b>LOPD</b>	Ley de Protección de Datos
<b>M</b>	Mujer
<b>MAPM</b>	Multímeros de alto peso molecular
<b>n</b>	Valor absoluto
<b>N</b>	Plasma normal
<b>NGS</b>	Secuenciación de nueva generación (“ <i>Next Generation Sequencing</i> ”)
<b>PCM-EVW-ES</b>	Perfil Clínico y Molecular de pacientes con enfermedad de von Willebrand en España.
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PFA-100</b>	Análisis de función plaquetaria
<b>ppFVW</b>	Propéptido de FVW
<b>PVDF</b>	Polifluoruro de vinilideno
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>S</b>	Puente disulfuro
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SV</b>	Vesícula secretora
<b>TH</b>	Tiempo de hemorragia
<b>TTPA</b>	Tiempo de tromboplastina parcial activada
<b>WB</b>	Cuerpos de Weibel-Palade

## RESUMEN

**Introducción:** La EVW es un desorden de la coagulación causada por defectos en la concentración, estructura o función del FVW, siendo el trastorno hemorrágico hereditario autosómico más frecuente. Para su diagnóstico es necesario aplicar un amplio panel de pruebas diagnósticas entre las que se encuentra el análisis de la estructura multimérica del FVW. **Material y métodos:** Se llevó a cabo un western blot para el estudio de la estructura multimérica del FVW en los 556 pacientes reclutados en el proyecto español PCM-EVW-ES y en 39 sujetos utilizados como controles normales. Se estudió la sensibilidad, especificidad y los valores predictivos de esta prueba diagnóstica. Además mediante análisis estadístico se estudió la relación entre el análisis multimérico y la puntuación hemorrágica y las razones FVW:RCo/FVW:Ag y FVW:CB/FVW:Ag. **Resultados:** Trescientos veintisiete sujetos presentaron una estructura multimérica del FVW normal, que se distribuyen del siguiente modo: 76 no cumplían criterios, 149 tipo 1, 5 tipo 2B, 38 tipo 2M, 9 tipo 2N, 30 portadores tipo 3, 11 portadores tipo 2N y 9 sin clasificar. Los 229 sujetos restantes presentaron alguna alteración en su estructura multimérica clasificados en los siguientes subtipos: 6 tipo 1 *smearly*, 110 tipo 2A, 30 tipo 2B, 34 tipo 2A/2M, 42 tipo 3 y 7 sin clasificar. Su sensibilidad y especificidad fueron del 97,81% y 97,62%, respectivamente. Se observó una relación directa entre la puntuación hemorrágica y las razones FVW:RCo/FVW:Ag y FVW:CB/FVW:Ag con la estructura multimérica del FVW. **Conclusiones:** El análisis multimérico del FVW es un método que cumple con las características adecuadas para el diagnóstico de la EVW, por lo que es necesario implementar esta metodología para su estudio y mejorar su diagnóstico específico.

**Palabras clave:** análisis multimérico, enfermedad de von Willebrand, factor von Willebrand, diagnóstico.

## RESUMO

**Introdución:** A EVW é unha desorde da coagulación causada por defectos na concentración, estrutura ou función do FVW, sendo o trastorno hemorráxico hereditario autosómico máis común. Para o seu diagnóstico é necesario aplicar un amplo panel de probas diagnósticas entre as que se atopa a análise da estrutura multimérica do FVW.

**Material e métodos:** Levouse a cabo un western blot para o estudo da estrutura multimérica do FVW nos 556 doentes recrutados no proxecto español PCM-EVW-ES e en 39 suxeitos empregados como controis normais. Foi estudada a sensibilidade, especificidade e os valores predictivos desta proba diagnóstica. Ademais mediante análise estatístico estudouse a relación entre a análise multimérica e a puntuación hemorráxica e as razóns FVW:RCo/FVW:Ag e FVW:CB/FVW:Ag.

**Resultados:** Trescentos vinte e sete suxeitos presentaron unha estrutura multimérica do FVW normal distribuíndose do seguinte xeito: 76 non cumpren criterios, 149 tipo 1, 5 tipo 2B, 38 tipo 2M, 9 tipo 2N, 30 portadores tipo 3, 11 portadores tipo 2N e 9 sen clasificar. Os 229 suxeitos restantes presentaron algunha alteración na súa estrutura multimérica clasificados nos seguintes subtipos: 6 tipo 1 *smearly*, 110 tipo 2A, 30 tipo 2B, 34 tipo 2A/2M, 42 tipo 3 e 7 sen clasificar. A súa sensibilidade e especificidade foron do 97,81% e 97,62%, respectivamente. Observouse unha relación directa entre a puntuación hemorráxica e as razóns FVW:RCo/FVW:Ag e FVW:CB/FVW:Ag coa estrutura multimérica do FVW. **Conclusións:** A análise dos multímeros do FVW é un método que cumpre coas características axeitadas para o diagnóstico da EVW, polo que é necesario aplicar esta metodoloxía para o seu estudo e mellorar o diagnóstico específico.

**Palabras clave:** análise multimérico, enfermidade de von Willebrand, factor von Willebrand, diagnóstico.

## ABSTRACT

**Introduction:** VWD is a bleeding disorder caused by defects in concentration, structure or function of VWF, being the most frequent autosomal hereditary bleeding disorder. For its diagnosis it is necessary to apply a broad panel of diagnostic tests including the analysis of the VWF multimer structure. **Material and methods:** We carried out a western blot to study the VWF multimeric structure in the 556 patients recruited in the Spanish project PCM-EVW-ES and 39 subjects used as normal controls. Sensitivity, specificity and predictive values of this diagnostic test were studied. Additionally by statistical analysis was studied the relationship between the multimeric analysis and the bleeding score and VWF:RCo/VWF:Ag and VWF:CB/VWF:Ag ratios. **Results:** Three hundred twenty-seven subjects had a normal multimeric structure of VWF which are distributed as follows: 76 no criteria, 149 type 1, 5 type 2B, 38 type 2M, 9 type 2N, 30 carriers 3, 11 carriers 2N and 9 unclassified. The remaining 229 subjects had some alteration in their multimeric structure classified into the following subtypes: 6 type 1 *smearly*, 110 type 2A, 30 type 2B, 34 type 2A/2M, 42 type 3 and 7 unclassified. Its sensitivity and specificity were 97.81% and 97.62%, respectively. A direct relationship was observed between the bleeding score and VWF:RCo/VWF:Ag and VWF:CB/VWF:Ag ratios with the VWF multimer structure. **Conclusions:** The multimeric analysis is a method appropriate for the diagnosis of VWD characteristics, so it is necessary implement this methodology to its study and improves their specific diagnosis.

**Keywords:** multimeric analysis, von Willebrand disease, von Willebrand factor, diagnostic.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 PERSPECTIVA HISTÓRICA

En 1926, el médico finlandés Erik von Willebrand describió por primera vez un desorden hemorrágico que había observado en varios miembros de una familia que residía en la isla de Flögö, archipiélago de Åland en el Golfo de Bostnia.<sup>1</sup> El *propositus* era una niña de 5 años, Hjördis S., que sufría frecuentes episodios de sangrado nasal. Hjördis era una de 12 hermanos de los cuales todos menos 2 habían tenido síntomas de sangrado (Figura 1).

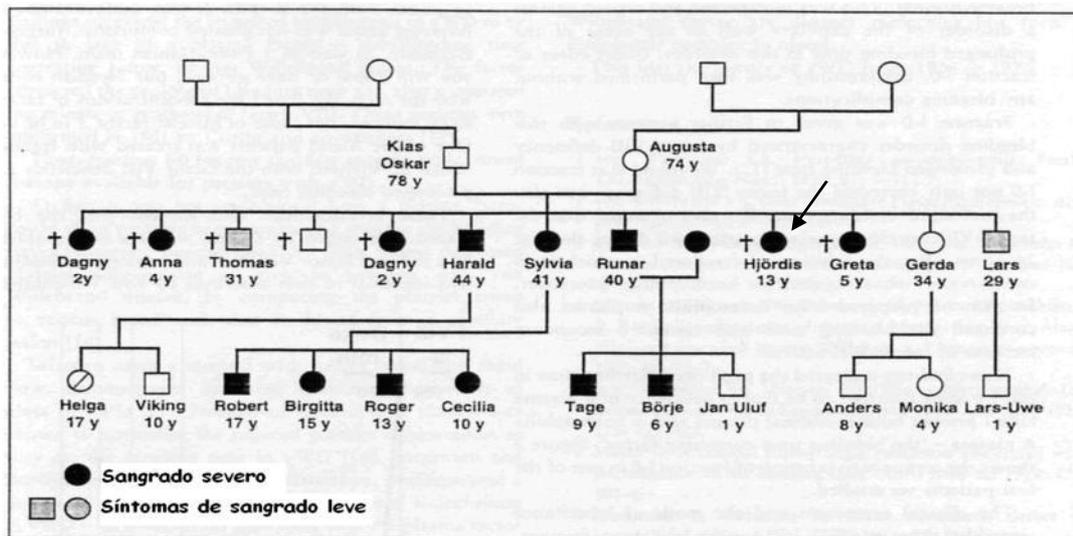


Figura 1. Árbol genealógico de la familia S. Föglö.

Los síntomas predominantes de esta enfermedad consistían en hemorragias nasales, gingivorragias y después de una extracción dental, hemorragias del tracto genital femenino y sangrado de heridas triviales. Sin embargo, las hemartrosis, comunes en hemofilia, eran relativamente raras. Afectaba tanto a mujeres como a varones por lo que parecía ser de tipo hereditario autosómico dominante. Von Willebrand finalmente denominó a esta enfermedad como “Hereditär Pseudohefemofili”<sup>2</sup> e interpretó la causa de esta enfermedad como un defecto en la alteración funcional plaquetaria y en las paredes de los vasos sanguíneos.

En 1957,<sup>3</sup> un grupo de investigadoras suecas (Nilsson, Blombäck y Francken) describieron 13 miembros de 10 familias en Suecia que tenían desórdenes hemorrágicos severos caracterizados por una deficiencia en el factor VIII (FVIII), tiempo de sangrado prolongado, herencia autosómica dominante y variable expresividad clínica. La transfusión de concentrados plasmáticos ricos en fibrinógeno y FVIII a estos pacientes no sólo les corregía los episodios hemorrágicos sino que además les elevaba el nivel de FVIII plasmático y les acortaba el tiempo de hemorragia. Este hallazgo demostraba que el defecto no era plaquetario ni capilar y que residía en la carencia de un factor plasmático. Es más, la administración a estos pacientes con plasma procedente de pacientes hemofílicos, carente de FVIII, también era capaz de corregir el tiempo de hemorragia de los pacientes con enfermedad de von Willebrand (EVW), que a su vez no se corregían con las transfusiones de las plaquetas. Estos estudios indicaban que el defecto hemostático en los pacientes con EVW podía ser corregido con una proteína del plasma, la cual debía ser diferente del FVIII.

Al comienzo de los años 70, la purificación parcial del FVIII rendía una proteína que se llamó "*factor VIII-related antigen*", la cual era deficiente en el plasma de los pacientes con EVW mientras que en los pacientes con hemofilia A se encontraba en cantidades normales.<sup>4</sup>

En 1972,<sup>5</sup> Holmberg y Nilsson indicaron la posibilidad de diferentes variantes genéticas de la EVW ya que algunos miembros de las familias afectadas mostraron tener niveles normales de factor von Willebrand (FVW), antiguamente conocido como "*factor VIII-related antigen*". Peake et al, en 1974, demostraron que la EVW podría estar asociada con anomalías cualitativas del FVW.<sup>6</sup>

Ya a mediados de los 80 se consiguió clonar el ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) del FVIII (1984) y del FVW (1985), lo que permitió un mejor entendimiento de estos dos factores. Gracias al descubrimiento en 1985 de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y de la aplicación de la *Taq* polimerasa en 1987, se pudieron identificar

mutaciones puntuales en los ácidos desoxirribonucleicos (ADNs) de gran número de hemofílicos y pacientes con EVW.<sup>7</sup> El gen del FVW (*FVW*) humano está localizado en el brazo corto del cromosoma 12 (12p13.2) y está dividido en 52 exones y 51 intrones. Su estructura genómica fue publicada en 1989 por Mancuso et al.<sup>8</sup> El conocimiento de la estructura y secuencia del gen condujo al hallazgo de mutaciones en diferentes tipos de EVW.

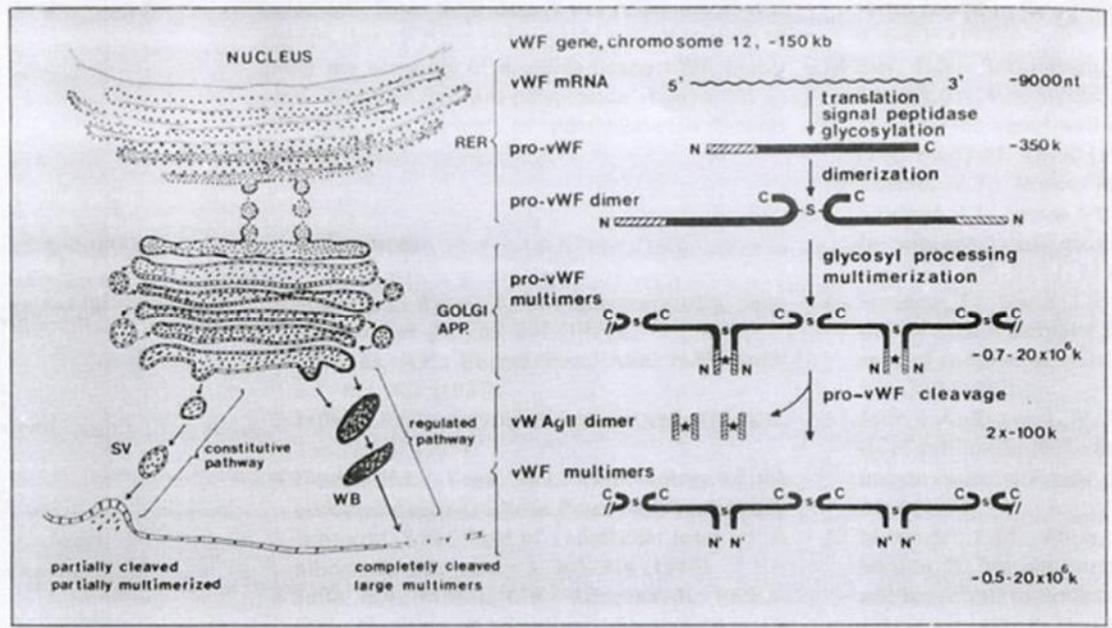
## **1.2 FACTOR VON WILLEBRAND**

El FVW es una glicoproteína adhesiva de gran tamaño, cuyo peso molecular oscila entre 0.5 y  $20 \times 10^3$  kilodaltons (KDa), de carácter multimérico que participa en la coagulación. Se encuentra en el plasma sanguíneo, en los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas, en los corpúsculos de Weibel-Palade del endotelio y en el tejido conectivo subendotelial.<sup>9</sup>

Su concentración plasmática es aproximadamente 10  $\mu\text{g/mL}$ , que corresponde a 100 UI/dL o 100%, aunque su rango de normalidad suele ser amplio y puede variar entre 50-200%. Su vida media es de 8 a 12 horas.<sup>10</sup>

### **1.2.1 Biosíntesis del FVW**

El FVW es sintetizado en las células endoteliales<sup>11</sup> y en los megacariocitos.<sup>12</sup> Se sintetiza en forma de molécula precursora de ~ 2813 aminoácidos (aa) (300-350 KDa), que se conoce como pre-pro-FVW. Contiene un péptido señal de 22 aa, un propéptido de 741 aa y una proteína madura de 2050 aa. Mediante una serie de complejos eventos post-translacionales, esta molécula es modificada para producir una subunidad de FVW maduro de 2050 aa (con peso molecular de ~ 260 kDa) que es secretada de la célula de síntesis (Figura 2).



**Figura 2. Resumen de los cambios post-traslacionales que tienen lugar durante la biosíntesis del FVW.** Las barras de la derecha de este esquema representan la proteína precursora del FVW y el procesamiento de los productos derivados de ello. El área rayada indica el propéptido y el área oscura el FVW maduro. WB = cuerpos de Weibel Palade; SV = vesículas secretoras; \* = interacción no covalente; S = puentes disulfuro.

El propéptido inicia el proceso de formación de la proteína del FVW en el retículo endoplasmático y forma dímeros mediante puentes disulfuro en las posiciones carboxiterminales, por la enzima disulfuroisomerasa. Posteriormente se lleva a cabo la glicosilación y se transporta al aparato de Golgi donde la proteína madura de 2050 aa forma puentes de disulfuro en las porciones aminoterminales de los dímeros, y como consecuencia, una serie lineal de multímeros de diferentes tamaños que van desde una sola unidad fundamental de 225 kDa (protómero) hasta 120 000 kDa.<sup>13</sup> (Figura 2).

La multimerización continúa después del tránsito por el aparato de Golgi, donde comienza la ruptura del propéptido.<sup>14</sup> Éste es esencial en la formación de los multímeros, y de hecho *in vitro*, la expresión de una variante a la que le faltaba este fragmento no polimerizaba, aunque los

dímeros se formaban normalmente,<sup>15</sup> lo que implica que la dimerización y la multimerización son reacciones independientes.

La estructura de la proteína del FVW está formada por varios dominios repetidos en el orden D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-CK. El FVW posee la capacidad de interactuar con residuos de otras proteínas en distintos dominios de cada subunidad, lo cual induce a pensar que el proceso de multimerización sirve para aumentar estos lugares de unión, incrementando su eficacia (Figura 3). Los dominios D1, D2, D' y D3 participan en la regulación del proceso de formación de multímeros, y las regiones D' y D3 también median la unión con el FVIII y la heparina.<sup>16</sup> Tanto el dominio A1 como el A3 poseen propiedades de unión al colágeno.<sup>17,18</sup> Además el dominio A1 contiene lugares de unión para la heparina y los sulfátidos. Los sitios donde el FVW se une a las plaquetas son: en el dominio A1 al receptor plaquetario GpIb/IX (GpIb/IX) y en el dominio C2 al receptor GpIIb/IIIa (GpIIb/IIIa).<sup>17,19</sup>

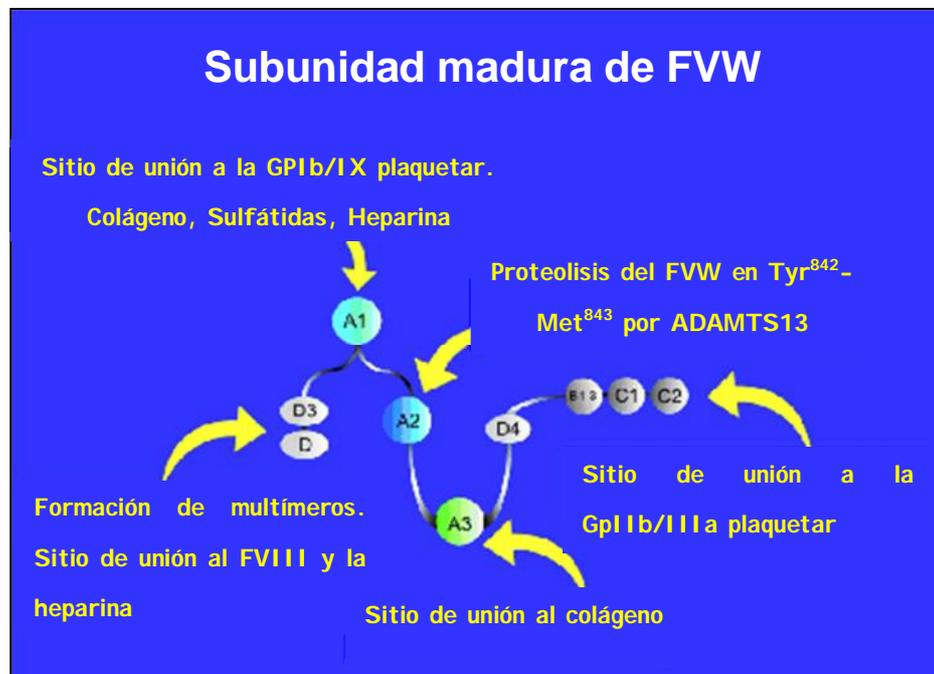


Figura 3. Representación esquemática de la subunidad madura del FVW y sus dominios de unión.

### 1.2.2 Secreción y almacenamiento del FVW

El FVW se distingue de otras proteínas en que puede ser excretado por más de una ruta, la constitutiva y la reguladora. La mayoría del FVW, posiblemente el 95%, es secretado constitutivamente. Esto supone que tan pronto se produce la síntesis, las moléculas son liberadas. La ruta reguladora implica el almacenamiento del FVW bien en los cuerpos de Weibel-Palade que se originan a partir del aparato de Golgi o en los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas cuando el FVW procede de los megacariocitos.<sup>20</sup> En las células endoteliales, el FVW está formado fundamentalmente por multímeros de alto peso molecular (MAPM), mientras que el FVW secretado constitutivamente por el camino no regulado, contiene generalmente pequeños polímeros y una alta proporción de pro-FVW no procesado (Figura 4).

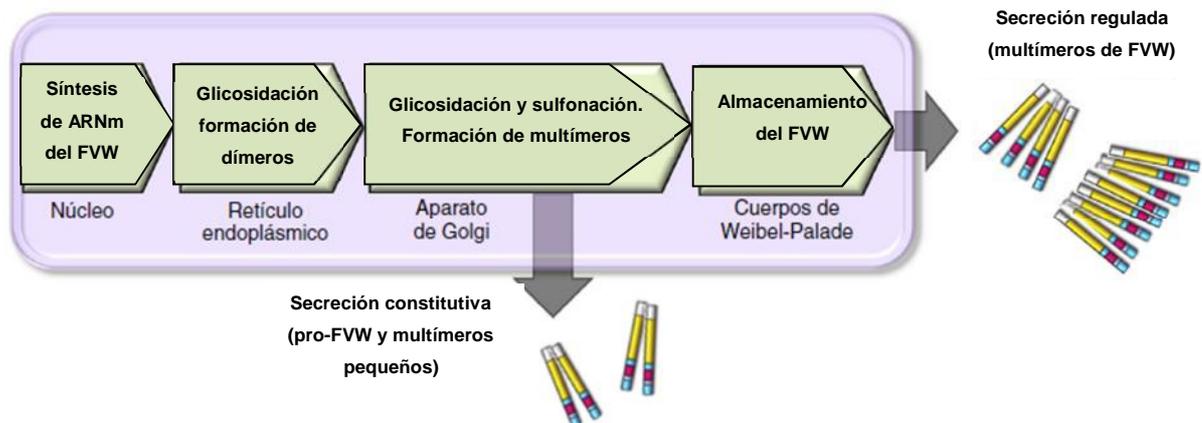


Figura 4. Esquema del procesamiento y secreción del FVW.

El FVW comparte estos sitios de almacenamiento con otras proteínas que se liberan en respuesta a una variedad de estímulos fisiológicos y farmacológicos, incluyendo trombina, fuerza de cizallamiento (*shear stress*) y desmopresina.<sup>21</sup> Actualmente, se sabe que tras su liberación de la célula donde se sintetiza, los multímeros del FVW extremadamente grandes y de alto peso molecular se unen a la superficie de la célula endotelial mediante interacción con la proteína P selectina de los cuerpos

de Weibel-Palade. En este sitio, se ven sometidos a la fuerza de cizallamiento del flujo sanguíneo y a la reducción fisiológica de su tamaño por fragmentación proteolítica controlada, por la metaloproteinasa ADAMTS13 que actúa sobre ellos en el dominio A2, entre los años 1605 y 1606 (Figura 3).<sup>22,23</sup> Este proceso origina las diferentes formas del factor que van desde dímeros simples, hasta las 20 unidades que forman el multímero más complejo. La degradación proteolítica de los multímeros es un evento normal, ya que éstos tienen un elevado potencial trombogénico, por los sitios de interacción con las plaquetas, y la pared de los vasos sanguíneos. En condiciones de homeostasis esta reacción inhibe el crecimiento del trombo que forman las plaquetas.<sup>24,25</sup> Así la regulación normal del tamaño del multímero del FVW y la preservación de los diversos sitios de unión en la subunidad del FVW son indispensables para su función fisiológica.

### **1.2.3 Funciones del FVW**

El FVW realiza dos funciones biológicas esenciales:<sup>9</sup> 1) Actúa como puente de unión específico entre: (I) plaquetas y pared vascular (adhesión plaquetar), y (II) entre las propias plaquetas (agregación plaquetar y formación del trombo). 2) En la hemostasia secundaria modula la supervivencia y función del FVIII, protegiéndolo de una degradación proteolítica prematura.

Así el FVW es una pieza clave en la interacción endotelio-plaqueta, y desempeña un papel relevante en la formación del trombo en la pared vascular.

## **1.3 LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND**

La EVW es el trastorno hemorrágico hereditario autosómico más frecuente.<sup>26</sup> Este desorden de la coagulación es causado por defectos en la concentración, estructura o función del FVW.

La EVW es muy heterogénea, con diferentes fenotipos cuya sintomatología clínica varía en su gravedad. Las manifestaciones clínicas más características son hemorragias mucocutáneas (epistaxis, hematomas, hemorragia en cavidad oral y menorragias). Los hematomas de partes blandas, así como la hemartrosis, son raras y acontecen en los casos graves como consecuencia de deficiencia de FVIII.<sup>27</sup> La variabilidad de estas manifestaciones en la EVW es una característica destacable.

En estudios llevados a cabo sobre la EVW,<sup>28,29</sup> la prevalencia en mujeres es aproximadamente el doble de la documentada en varones, probablemente debido al potencial único de menorragia (sangrado excesivo durante la menstruación).

En el año 2011 se llevó a cabo una encuesta con el fin de obtener una aproximación de la prevalencia de la EVW en España, con la participación de un elevado número de centros (36 centros, 5 CTH entre ellos).<sup>30</sup> Se estimó una prevalencia de pacientes con diagnóstico claro de EVW de 122 por millón de habitantes, bastante más alta que la observada en otros países europeos. La prevalencia estimada en Italia oscila entre 40 y 100 pacientes por millón de habitantes.<sup>31</sup> Estos resultados pueden indicar un sobrediagnóstico de la EVW en España o bien una subestimación inicial en otros países.

### **1.3.1 Clasificación**

De acuerdo con la revisión actualizada para la clasificación de la EVW,<sup>32</sup> se distinguen tres grandes grupos (Tabla 1).

Estas categorías se corresponden con diferentes mecanismos fisiopatológicos con distintos patrones clínicos y requerimientos terapéuticos:

- La **EVW tipo 1** es la forma más común, suponiendo aproximadamente el 75% de los casos, aunque debido a su gran dificultad

de diagnóstico, su prevalencia podría variar. Se refiere a una deficiencia parcial cuantitativa. Su herencia es autosómica dominante.

Tabla 1. Clasificación revisada de la EVW.

TIPO	DESCRIPCIÓN	FRECUENCIA
1	<b>Deficiencia cuantitativa parcial del FVW</b>	65-80%
2	<b>Deficiencia cualitativa del FVW</b>	20-35%
2A	Disminución de la adhesión plaquetar del FVW y deficiencia selectiva de los MAPM*	
2B	Aumento de la afinidad del FVW por la glicoproteína Ib plaquetar	
2M	Disminución de la adhesión plaquetar del FVW sin deficiencia selectiva de los MAPM	
2N	Disminución de la afinidad del FVW por el FVIII	
3	<b>Deficiencia virtualmente completa del FVW</b>	1 x millón de habitantes

\*MAPM: multímeros de alto peso molecular del FVW. Tomado de Sadler et al.<sup>32</sup>

- La **EVW tipo 2A** incluye variantes cualitativas con la función de las plaquetas disminuida, asociada con la ausencia de MAPM. El diagnóstico de este subtipo depende de la distribución de sus multímeros. En una clasificación anterior<sup>33</sup> se distinguen distintos subtipos en función del grado de proteólisis de la molécula del FVW (2A/IIA, 2A/IIC, 2A/IID y 2A/IIIE)

- La **EVW tipo 2B** se caracteriza por un aumento en la afinidad del FVW por la GpIb plaquetar. Esto conduce a una unión espontánea de las formas multiméricas de mayor tamaño a las plaquetas, lo que conlleva una disminución tanto del FVW como de las plaquetas. Su herencia es autosómica dominante.

- La **EVW tipo 2M** incluye variantes en las que la unión a las plaquetas está disminuida pero no está asociada con la ausencia de multímeros de gran tamaño. Este fenotipo podría estar causado por mutaciones que inactivan el sitio de unión específico del FVW a las

plaquetas o con el subendotelio. Su transmisión también es autosómica dominante.

- La **EVW tipo 2N** se refiere a variantes con un marcado decrecimiento de la afinidad del FVW por el FVIII. El nivel de FVIII es bajo, a menudo <10%, y el FVW no siempre está disminuido. Cuando el nivel de FVW es normal, puede confundirse con la hemofilia A. Su transmisión es recesiva y su prevalencia podría ser más alta de lo que actualmente se aprecia.

- La **EVW tipo 3** es un desorden recesivo en el que no se detecta FVW. La ausencia de FVW causa un defecto secundario de FVIII y un severo defecto combinado en la adhesión plaquetar y formación del trombo.

Aunque ésta es la clasificación internacionalmente aceptada, por parte de investigadores relevantes vienen incluyendo diferentes tipos a los ya especificados. Por ello, y especialmente de cara este registro, nos hemos visto obligados a incluir algunas modificaciones que consideramos indispensables, a la espera de una nueva clasificación internacional. A continuación se indican las modificaciones o nuevos subtipos de EVW propuestos:

- **Tipo 1 Histórico (1H):** deficiencia cuantitativa parcial en el pasado pero con valores normales del FVW en la actualidad.
- **Tipo 1 “smearly”:** deficiencia cuantitativa parcial con un patrón multimérico del FVW anormal.
- **Tipo 2CB:** disminución la afinidad del FVW por colágeno tipo IV y VI.
- **Tipo 2 “clearance” (2C):** deficiencia cualitativa del FVW con una reducción de su supervivencia in vivo.
- **Compuestos heterocigotos:** fenotipo mixto causado bien por dos mutaciones que afectan cada una a un alelo (ej. 1/2N; una mutación tipo 1 y una mutación tipo 2N) o por una mutación que provoca dos fenotipos distintos.

### **1.3.2 Diagnóstico**

El diagnóstico de la EVW se basa en la historia clínica de diátesis hemorrágica (personal y familiar) y en distintas pruebas de laboratorio.

#### **→ Historia clínica de diátesis hemorrágica**

Debe enfocarse la historia personal de diátesis hemorrágica patológica, sopesando la intensidad o gravedad, frecuencia y duración del episodio, así como de las actuaciones médicas acontecidas con anterioridad para controlar las hemorragias. Asimismo, también debe ser considerado cualquier dato relevante de diátesis hemorrágica en la historia familiar, y tener en cuenta posibles medicaciones recientes recibidas por el paciente.

Es muy aconsejable realizar una anamnesis sistemática a través de un cuestionario que incluya la sintomatología hemorrágica más frecuente en la EVW, con el fin de obtener la información más objetiva posible. Recientemente, se ha propuesto un sistema estandarizado de puntuación de síntomas (“*bleeding score*” (BS) o puntuación hemorrágica) en base a un baremo hemorrágico (Anexo I).<sup>34</sup>

#### **→ Pruebas de laboratorio**

Deben considerarse tres niveles de estas pruebas en el proceso diagnóstico: pruebas de detección o cribado, pruebas de confirmación y pruebas de definición del subtipo (Tabla 2).<sup>35</sup>

- **Factor VIII procoagulante (FVIII:C)**

Mide la actividad procoagulante del FVIII. En el contexto de la EVW, tiene interés para valorar la deficiencia secundaria de esta proteína, bien debida a la disminución del FVW, su proteína transportadora y protectora, o por anomalía molecular de esta última, que le impide unirse adecuadamente a la primera, como sucede en el tipo 2N. Su titulación también es de interés para valorar si existe o no desproporción entre el FVIII y el FVW.

Tabla 2. Pruebas de laboratorio para diagnosticar la EVW

<b>PRUEBAS DE CRIBADO</b>
• Análisis de función plaquetar (PFA-100)
• Recuento plaquetar
• Tiempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA)
<b>PRUEBAS CONFIRMATORIAS</b>
• Antígeno del FVW (FVW:Ag)
• Adhesión plaquetar dependiente del FVW (FVW:RCo)
• Actividad del FVIII (FVIII:C)
<b>PRUEBAS PARA LA DEFINICIÓN DEL SUBTIPO</b>
• Aglutinación plaquetar inducida por ristocetina (RIPA)
• Análisis multimérico
• Capacidad de unión del FVW al colágeno (FVW:CB)
• Capacidad de unión del FVW al FVIII (FVW:FVIII B)
• Estudio de mutaciones del <i>FVW</i>

Tomado de Budde et al. <sup>35</sup>

▪ Antígeno del FVW (FVW:Ag)

Mide la concentración de la proteína del FVW independientemente de su actividad funcional. Existen diversos métodos disponibles, siendo los más utilizados en la actualidad los ELISA y los basados en turbidometría automatizados que emplean partículas de látex (LIA: *latex-immuno-assay*).

▪ Actividad del FVW como cofactor de la ristocetina (FVW:RCo)

Representa la actividad funcional del FVW y mide su capacidad de interacción con el receptor Ib de plaquetas normales inducida por el antibiótico ristocetina. En realidad, *in vivo* el papel de la ristocetina lo ejerce el estrés circulatorio en la microcirculación, que es el que causa los cambios conformacionales del FVW que conducen a su interacción con la

plaqueta. Puesto que detecta la interacción entre el FVW y Gplb, el FVW:RCo es un test especialmente indispensable para el diagnóstico de EVW de los tipos 2A y 2M. Se disponen de distintos métodos de medición de este parámetro en donde la aglutinación del FVW a plaquetas lavadas o fijadas en presencia de ristocetina es medida por transmisión de luz en un agregómetro (considerado el método "Gold standard").

- Capacidad de unión del FVW al colágeno (FVW:CB)

Se determina utilizando la técnica de ELISA. Entre otros aspectos permite identificar las anomalías selectivas en la unión del FVW al colágeno. En aquellos laboratorios en los que no se puede realizar el análisis multimérico del FVW, la técnica del FVW:CB podría ayudar a discriminar entre la mayoría de los tipos 2A (IIA, IIC, IID) y el tipo 2M, siempre y cuando la razón FVW:RCo/FVW:Ag esté decrecida.

- Razones FVW:RCo/FVW:Ag, FVW:CB/FVW:Ag y FVIII:C/FVW:Ag

Las razones de estos parámetros pueden ser de ayuda a la hora de orientar una forma variante. Así, por ejemplo, ante un FVW:RCo/FVW:Ag < 0,5-0,7 orienta a la existencia de una forma variante 2A, 2B o 2M; y ante un FVIII:C/FVW:Ag descendido puede orientar a una forma 2N, precisando la comprobación con otras pruebas adicionales, incluso el estudio genético. Sin embargo, los puntos de corte de estas razones todavía están siendo motivo de estudio, aunque la mayoría de laboratorios utilizan 0,6 ó 0,7.

- Capacidad de unión del FVW al FVIII (FVW:FVIII B)

Mide la normalidad del FVW en el dominio a través del cual se une al FVIII normal. Su objetivo es confirmar el tipo 2N de EVW, que es recesiva. Se realiza habitualmente mediante método ELISA.

- Análisis multimérico del FVW

Consiste en el análisis electroforético cualitativo del FVW, en geles de alta y baja resolución de agarosa que permite la separación de esta proteína en forma de una serie linear de multímeros según su diferente tamaño molecular. Los geles de alta resolución permiten observar el grado de proteolización de la molécula y los de baja resolución la ausencia o no de multímeros.

Esta metodología es laboriosa, requiere mucho tiempo en su realización y exige amplia experiencia, por lo que su uso se circunscribe a centros altamente especializados en el estudio de la EVW o dedicados a la investigación en esta área.

- Estudio genético del FVW

Los estudios genéticos permiten encontrar mutaciones y polimorfismos que, además de completar el diagnóstico, facilitan el consejo genético. En el año 2012 se aplicó por primera vez la técnica de Secuenciación de Nueva Generación o “*Next Generation Sequencing*” (NGS) al FVW.<sup>36</sup>

**→ Limitaciones e inconvenientes de las pruebas diagnósticas**

Las pruebas mencionadas anteriormente presentan ciertas limitaciones o inconvenientes:<sup>37</sup>

1. FVW:Ag – mide el nivel de proteína pero no su funcionalidad.
2. FVW:RCo – precisión pobre, alta variabilidad y baja sensibilidad en niveles bajos de FVW.
3. FVW:CB – medida de actividad con mayor precisión, menor variabilidad y mayor sensibilidad a bajos niveles de FVW. Las pruebas comerciales disponibles difieren en cuanto a sensibilidad a MAPM del FVW, y por lo tanto la discriminación de EVW tipo 1 y 2. En la actualidad, ni el colágeno tipo IV ni el colágeno tipo VI forman parte de la rutina clínica de la EVW, sin embargo recientemente se han descubierto mutaciones que manifiestan una disminuida unión a

estos dos tipos de colágeno, las cuales se asocian a clínica hemorrágica (EVW tipo 2CB).

4. Razón actividad/Ag – los valores de corte para la discriminación de los tipos 2 de EVW varían con los ensayos (0,5-0,7).

El diagnóstico de esta enfermedad es difícil, dada su heterogeneidad y la necesidad de un amplio panel de pruebas necesarias para concretar su fenotipo. Mientras que un diagnóstico certero es fácil ante una reducción grave del FVW, el diagnóstico de formas leves debe hacerse sopesando el posible riesgo de un tratamiento excesivo. La exclusión de la EVW debe basarse en la repetida observación de resultados normales, y en la congruencia entre FVW:Ag y FVW:RCo.

Dada estas dificultades diagnósticas, el objetivo del presente trabajo es analizar la estructura multimérica del FVW en una amplia cohorte de pacientes diagnosticados con EVW así como evaluar el uso de esta prueba en el diagnóstico y clasificación de esta enfermedad. Para ello se valoró su sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de variantes cualitativas de la EVW y su relación con las restantes pruebas fenotípicas empleadas en el laboratorio.

## **2. METODOLOGÍA**

### **2.1 DISEÑO DEL ESTUDIO**

Para la realización de este estudio se utilizaron los pacientes reclutados en el proyecto “Pérfil clínico y molecular de pacientes con enfermedad de von Willebrand en España (PCM-EVW-ES)” llevado a cabo entre 2010 y 2015. En este proyecto participaron 38 centros distribuidos por todo el territorio español, siendo el CHUAC (A Coruña), el Hospital La Fe (Valencia) y el Banc de Sang i Teixitis (Barcelona) los tres laboratorios centrales de dicho proyecto. Para más información sobre el protocolo de este proyecto ver Batlle et al., 2016.<sup>38</sup>

Además, se reclutaron 39 sujetos sanos no relacionados con ningún paciente que se utilizaron como controles normales para el estudio fenotípico y genético.

En la realización de este estudio se respetaron las Normas de Buena Práctica Clínica, se siguieron los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos recogidos en la Declaración de Helsinki y se cumplió la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD). Cada participante incluido en este proyecto firmó el correspondiente consentimiento informado, siendo motivo de exclusión el no firmarlo.

## **2.2 ANÁLISIS MULTIMÉRICO DEL FVW**

Este ensayo está basado en el método descrito originalmente por Ruggeri y Zimmerman en 1981<sup>39</sup> y modificado por el equipo investigador de A Coruña.<sup>40</sup> Las muestras plasmáticas tras ser diluidas en un tampón de carga según la cantidad de antígeno del FVW, se someten a electroforesis no reductora en presencia del agente desnaturalizante dodecilsulfato sódico (SDS, Sigma - Aldrich S.A., Madrid, España), en geles de baja resolución al 1% (Agarosa Seakem HGT (P), Iberlabo S.A., Madrid, España) y geles de alta resolución al 2% (Agarosa Type VII, Sigma - Aldrich S.A., Madrid, España).

A continuación, las proteínas son transferidas mediante transferencia eléctrica (Hoeffer TE65, Amersham Bioscience, Piscataway, EE. UU.) a una membrana inmobilon de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Millipore Corporation, Bedford, MA, EE. UU.), tratada previamente con metanol y agua destilada. La visualización de los multímeros se consigue mediante la incubación de la membrana primero con un anticuerpo (Ac) de conejo anti-FVW humano (Dako, Glostrup, Dinamarca), después con un Ac de cabra anti-IgG de conejo (Dako, Glostrup, Dinamarca) y por último con un Ac anti-IgG de cabra que contiene fosfatasa alcalina (Sigma - Aldrich S.A., Madrid, España), el cual desarrolla color usando una tinción histológica para dicha enzima y sustratos cromogénicos (Fast Blue RR SALT, Sigma-

Aldrich S.A., Madrid, España). Después de la tinción, las membranas fueron escaneadas mediante el programa Adobe® Photoshop versión 7.0.

Así mismo se evaluó su sensibilidad y especificidad en comparación con el diagnóstico final.

### **2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se efectuó un estudio descriptivo de las siguientes variables: *BS*, *FVIII:C*, *FVW:Ag*, *FVW:RCo*, *FVW:CB*, *FVW:RCo/FVW:Ag*, *FVW:CB/FVW:Ag*, *FVIII:C/FVW:Ag* y análisis multimérico. Las variables cuantitativas se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar (DE) y las variables cualitativas como valor absoluto (n) y porcentaje.

Se utilizó la prueba *t* de Student para comparar la puntuación hemorrágica media y las razones medias *RCo/Ag* y *CB/Ag* en función del patrón multimérico observado. El análisis de la varianza (ANOVA) se aplicó para determinar si existen diferencias significativas entre las medias de las razones anteriores en función del tipo de anomalía multimérica observada en el *FVW*. En todos los casos, se consideró estadísticamente significativo valores de “p” por debajo de 0,05. Para la realización del análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico R-Commander.

### **3. RESULTADOS**

Aunque en este registro se reclutaron un total de 556 pacientes procedentes de 330 familias históricamente diagnosticados de *EVW* en sus centros locales, tras el estudio fenotípico central y estudio genético se observó que solamente 480 pacientes cumplían al menos uno de los criterios de inclusión.<sup>30</sup> En los 556 sujetos reclutados se estudió la estructura multimérica del *FVW* en geles de agarosa-SDS de alta y baja resolución. No se detectaron anomalías multiméricas en los 39 sujetos control ni en los 76 sujetos que no cumplían con los criterios de

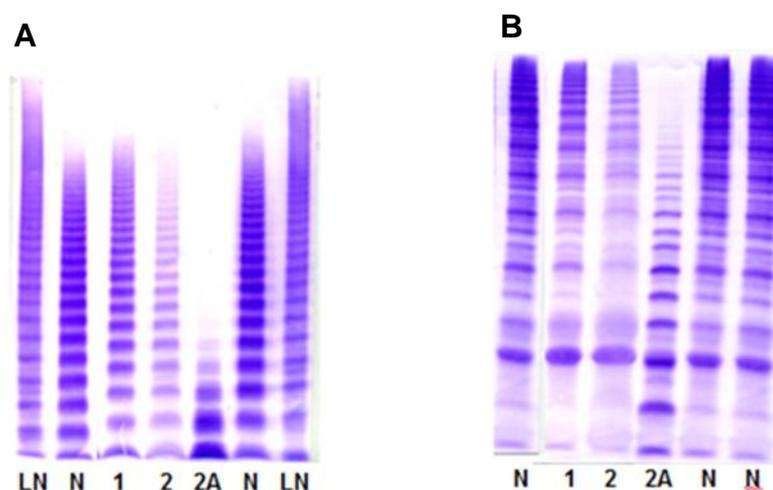
inclusión. A continuación se presentan los resultados obtenidos de este estudio según el tipo de EVW:

### 3.1 EVW TIPO 1

Ciento treinta y tres pacientes (27,7%) fueron diagnosticados de EVW tipo 1, bien porque se encontró una mutación descrita como tipo 1 y/o porque su estudio fenotípico se corresponde con la EVW tipo 1 (FVW:Ag, FVW:RCo y FVW:CB  $\leq$  30%). En función del estudio del patrón multimérico de la molécula del FVW distinguimos:

#### 3.1.1 EVW tipo 1 con patrón multimérico normal

Ciento veintisiete de los 133 pacientes con EVW tipo 1 (95,5%) presentaron una estructura multimérica del FVW normal con presencia de todos los multímeros, semejante a la de los sujetos control (Figura 5). Los datos del BS, FVIII:C, FVW:Ag, FVW:RCo, FVW:CB así como de las razones FVW:RCo/FVW:Ag, FVW:CB/FVW:Ag y FVIII:C/FVW:Ag se resumen en la Tabla 3. Tres pacientes presentaban valores de FVW:Ag < 6% y se consideraron como EVW tipo 1 grave, no obstante, su molécula de FVW presentaba todos los multímeros.



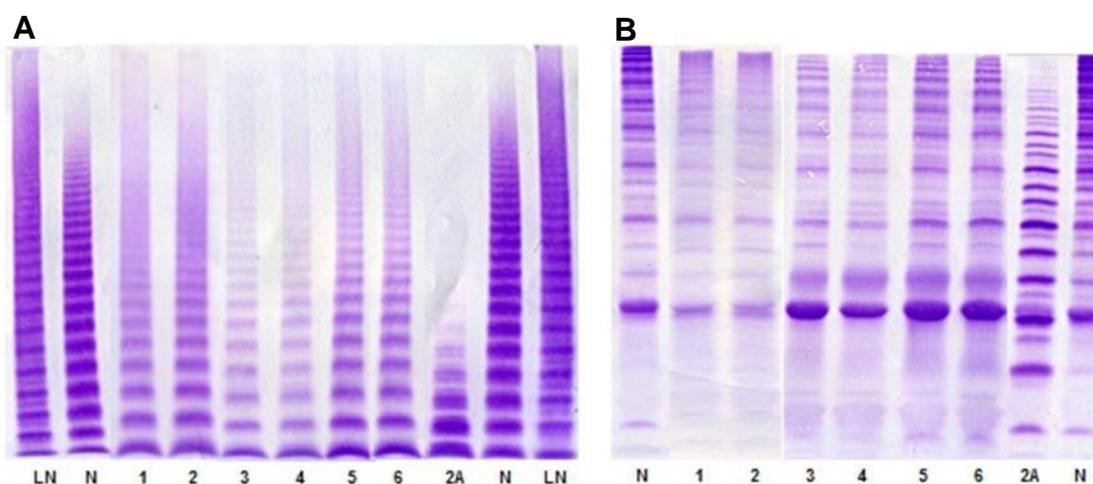
**Figura 5. Análisis multimérico del FVW plasmático en pacientes con EVW tipo 1. (A)** Representa el patrón multimérico en gel de agarosa-SDS de baja resolución (1%). **(B)** Muestra el perfil multimérico en gel de alta resolución (2%). Los pacientes 1 y 2 presentan una estructura multimérica normal en ambos geles, aunque como se puede observar el paciente 2 (EVW tipo 1 grave) tiene una cantidad de FVW menor que el paciente 1. LN= Lisado plaquetar normal; N= Plasma normal; 2A= control patológico de EVW 2A.

A nivel genético, 15 de estos pacientes no presentaron ninguna mutación en el *FVW* y 112 presentaron al menos una (67 con al menos una mutación descrita como tipo 1 y 45 con mutación no descrita previamente).

### 3.1.2 EVW tipo 1 con patrón multimérico "smear"

Los 6 pacientes restantes (4,5%) presentaron un patrón multimérico anormal, caracterizado por la presencia de componentes anormalmente extendidos, que no estaban organizados de un modo discontinuo sino que aparecían como una difuminación, no claramente artefactual, en la parte superior del gel de baja resolución (Figura 6A). En los geles de alta resolución el patrón de bandas satélite era normal (Figura 6B). Los valores obtenidos en las restantes pruebas fenotípicas se resumen en la Tabla 4.

Estos seis pacientes, pertenecientes a dos familias de centros distintos, fueron clasificados como EVW tipo 1 "smear", al presentar una estructura multimérica en "smear".



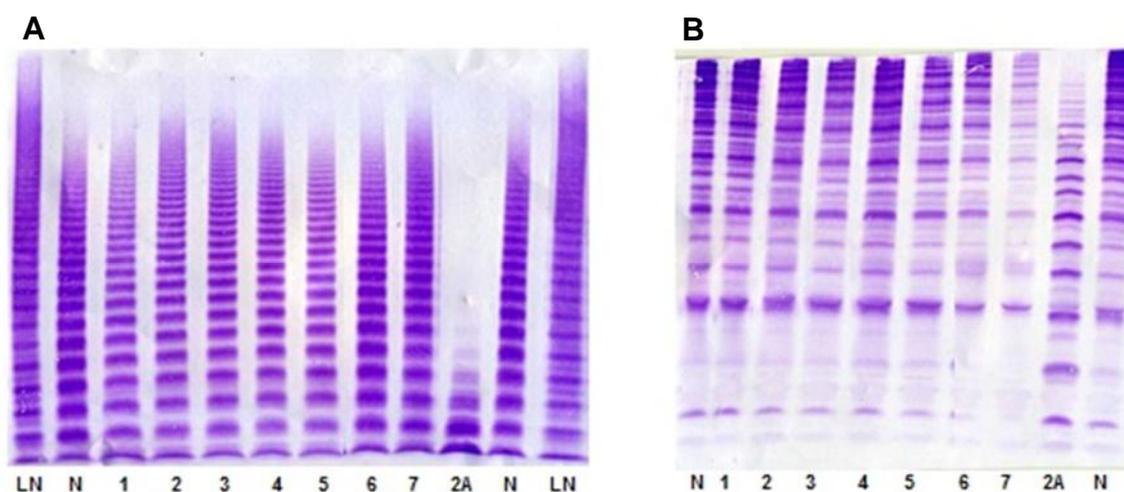
**Figura 6. Análisis multimérico del FVW plasmático en pacientes con EVW 1 "smear". (A)** Gel de agarosa - SDS de baja resolución (1%). **(B)** Gel de agarosa - SDS de alta resolución (2%). Los pacientes 1 y 2 pertenecen a la primera familia con la mutación c.7082-13G>C y los pacientes 3-6 pertenecen a la segunda familia con la mutación p.P1842H. En ambas familias observamos un patrón en "smear" en el gel de baja resolución (A) y un patrón semejante al del sujeto normal en el gel de alta resolución (B). LN = lisado plaquetar normal; N = Plasma normal; 2A = control patológico de EVW 2A.

A nivel genético cada familia presentaba una mutación: para la familia 1 la mutación responsable se encontró en el intrón 41 c.7082-13G>C y no fue descrita previamente mientras que para la familia 2 la mutación se localizó en el exón 28 p.P1824H, descrita anteriormente como causante de EVW tipo 1.

### 3.2 EVW TIPO 1 HISTÓRICO (1H)

Veintidós casos se clasificaron como EVW tipo 1H (4,6%). Se trata de pacientes que en el pasado fueron considerados EVW tipo 1 con valores de FVW:Ag < 30% pero actualmente presentaron valores superiores a este nivel. Sin embargo, todavía presentan síntomas clínicos y no deben ser considerados como sujetos completamente normales con respecto a la hemostasia. El patrón multimérico para este grupo de pacientes fue normal, tanto en geles de baja como alta resolución (Figura 7). Sus valores fenotípicos aparecen resumidos en la Tabla 3.

Todos estos pacientes, excepto en uno, presentaban mutación en el FVW. De las 22 mutaciones diferentes encontradas, el 50% estaban descritas previamente como mutaciones causantes de EVW tipo 1.



**Figura 7. Análisis multimérico del FVW plasmático en pacientes con EVW tipo 1H.** Los pacientes 1 - 7 presentan una estructura multimérica similar a los sujetos normales, tanto en geles de baja (1%) (A) como alta resolución (2%) (B). LN = Lisado plaquetar normal; N= Plasma normal; 2A = control patológico de EVW 2A.

### 3.3 EVW TIPO 2A

Se diagnosticaron 110 pacientes (22,9%) con EVW tipo 2A. Este tipo se caracteriza por una marcada reducción del FVW:RCo y del FVW:CB, como se puede observar en la Tabla 4, en relación con la cantidad de proteína (FVW:Ag) lo que supone que las razones actividad/Ag se encuentren disminuidas (razón < 0,70). Mientras que en geles de baja resolución la estructura multimérica del FVW experimentan una pérdida de multímeros de alto e intermedio peso molecular (Figura 8A), en geles de alta resolución observamos una mayor proteolización de la molécula por su mayor afinidad al enzima ADAMTS13 (Figura 8B). El análisis multimérico permite distinguir subtipos de la EVW 2A (IIA, IIC, IID y IIE) según el grado de proteólisis de la molécula. En esta población se han detectado 9 pacientes con EVW 2A/IIE y un paciente EVW 2A/IID.

Todos los pacientes presentaron una mutación descrita previamente como causante de este tipo de EVW. Prácticamente el total de estas mutaciones responsables de EVW 2A se localizan en los exones 26 y 28, aunque pueden estar localizadas por todo el *FVW*. La mutación p.C1149R (exón 26) fue la responsable del subtipo 2A/IIE mientras que el subtipo 2A/IID fue causado por la mutación p.C2773S (exón 52).

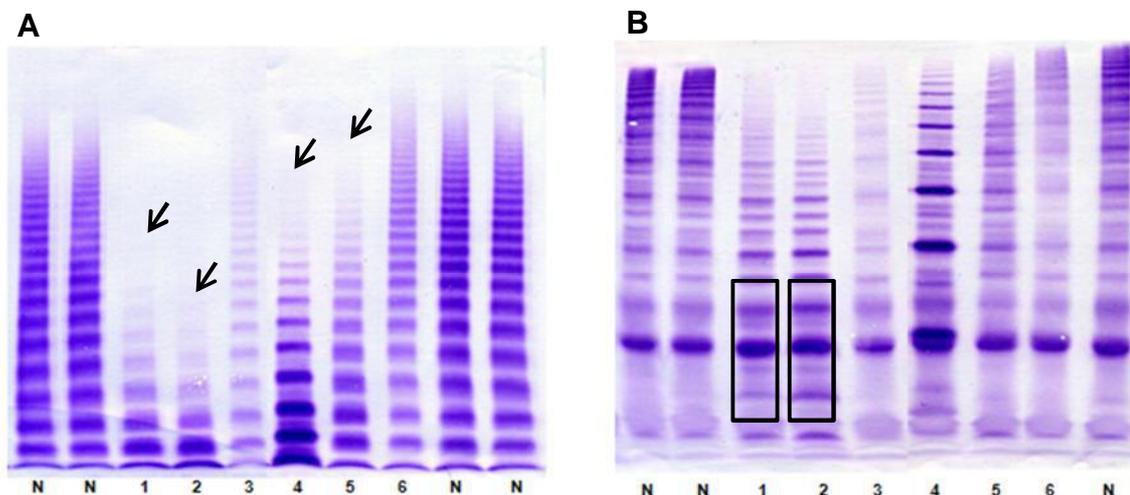
### 3.4 EVW TIPO 2B

Treinta y cinco pacientes (7,3%) presentaron características fenotípicas y mutaciones que se corresponden con la EVW tipo 2B. Los pacientes de este grupo presentan dos tipos de resultado en el estudio multimérico:

#### 3.4.1 EVW tipo 2B con patrón multimérico normal

De estos 35 pacientes con EVW tipo 2B, cinco (14,3%) presentaron una estructura de la proteína del FVW completamente normal, tanto en geles de baja como de alta resolución (Figura 8). El resto de pruebas fenotípicas también se encontraban dentro del rango de normalidad pero

tras el estudio genético la mutación encontrada se caracterizaba por un aumento en la afinidad del FVW por la GpIb plaquetar. Los valores del BS, FVIII:C, FVW:Ag, FVW:RCo, FVW:CB y las razones FVW:RCo/FVW:Ag, FVW:CB/FVW:Ag y FVIII:C/FVW:Ag se resumen en la Tabla 3.



**Figura 8. Análisis multimérico del FVW plasmático en pacientes con EVW tipo 2A y 2B. (A)** Gel de agarosa – SDS de baja resolución (1%). **(B)** Gel de agarosa – SDS de alta resolución (2%). Carril 1 y 2: pacientes con un perfil multimérico característico de un 2A/IIA, con pérdida de MAPM en el gel de baja resolución (A) y aumento de la proporción relativa de bandas satélites en el gel de alta resolución (B). Carril 3: paciente con un perfil multimérico 2A/IIE, con reducción de todos los multímeros pero especialmente los MAPM en el gel de baja resolución (A) y en el gel de alta resolución (B) una marcada disminución en la proporción de bandas satélites. Carril 4: paciente con EVW 2A/IID, caracterizado por una marcada disminución de los MAPM en el gel de baja resolución (A) y un patrón de bandas anormal en el gel de alta resolución (B). Carril 5: paciente con EVW 2B en el que se observó una disminución de MAPM en el gel de baja resolución (A) y un aumento en la proporción relativa de las bandas satélites en el gel de alta resolución (B). Carril 6: paciente con EVW 2B y análisis multimérico normal, con todos los multímeros tanto en geles de baja como alta resolución. N= Plasma normal; MAPM = multímeros de alto peso molecular

### **3.4.2 EVW tipo 2B con patrón multimérico anormal**

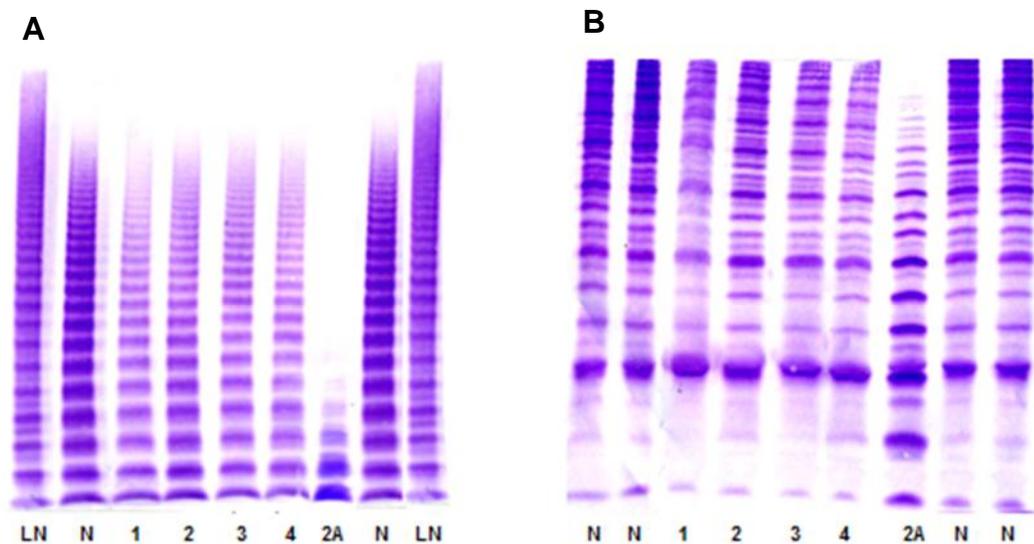
Los 30 pacientes (85,7%) restantes presentaron una disminución de los MAPM en geles de baja resolución (Figura 8A). Como se puede observar en la Tabla 4 este tipo de pacientes también se caracteriza, al igual que el tipo 2A, por la disociación entre el FVW:RCo y el FVW:CB con el FVW:Ag (razón < 0,7). En geles de alta resolución (Figura 8B) se observó un aumento en la proporción relativa de las bandas satélites.

Las mutaciones responsables de esta variante fueron localizadas todas en el exón 28.

### 3.5 EVW TIPO 2M

Treinta y ocho pacientes (7,9%) presentaron una disminución en la unión del FVW a las plaquetas, por lo que fueron clasificados como EVW 2M. Este tipo de EVW se caracteriza por una disminución del FVW:Ag, FVW:CB y principalmente del FVW:RCo lo que implica que la razón FVW:RCo/FVW:Ag se encuentra por debajo del 0,7 (Tabla 3). Sin embargo la estructura multimérica del FVW no se ve alterada en ningún paciente de este tipo (Figura 9).

Los 38 pacientes presentaron alguna alteración genética en el *FVW*; en 18 pacientes se encontró al menos una mutación descrita como 2M, 13 con mutación no descrita previamente y 7 presentaron una o más mutaciones descritas anteriormente como causantes de otros tipos de EVW.

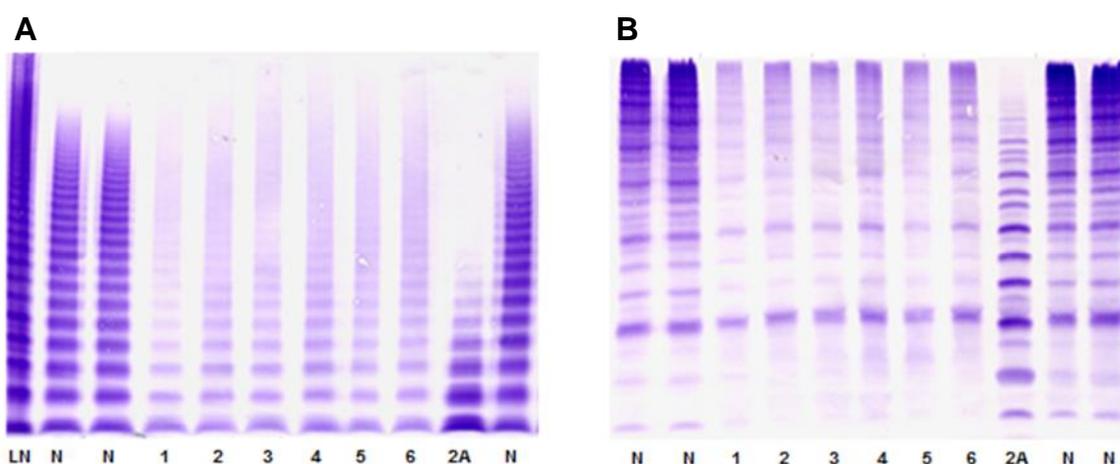


**Figura 9. Análisis multimérico del FVW plasmático en pacientes con EVW 2M.** En la figura se muestra una familia de cuatro miembros todos clasificados como EVW tipo 2M, el perfil multimérico es semejante al control normal tanto en geles de baja resolución (A) como en geles de alta resolución (B). LN = Lisado plaquetar normal; N = Plasma normal; 2A = control patológico de EVW 2A.

### 3.6 EVW TIPO 2A/2M

Treinta y cuatro pacientes (7,1%) fueron clasificados como EVW 2A/2M, puesto que presentaban características fenotípicas semejantes a los pacientes con EVW 2A (Tabla 4) pero, a diferencia de estos, su perfil multimérico se caracterizaba por una disminución de todos los componentes, lo que estaba más pronunciado en los multímeros de más alto peso molecular. Además, estos últimos estaban caracterizados por la presencia de unos componentes anormalmente extendidos que se presentaban en forma de difuminación (Figura 10).

Todos los sujetos con EVW 2A/2M presentaban al menos una mutación, siendo el cambio nucleotídico p.R1374C en el exón 28 el más frecuente, afectando a un 67,6% (23 pacientes), mutación predominante en Galicia.



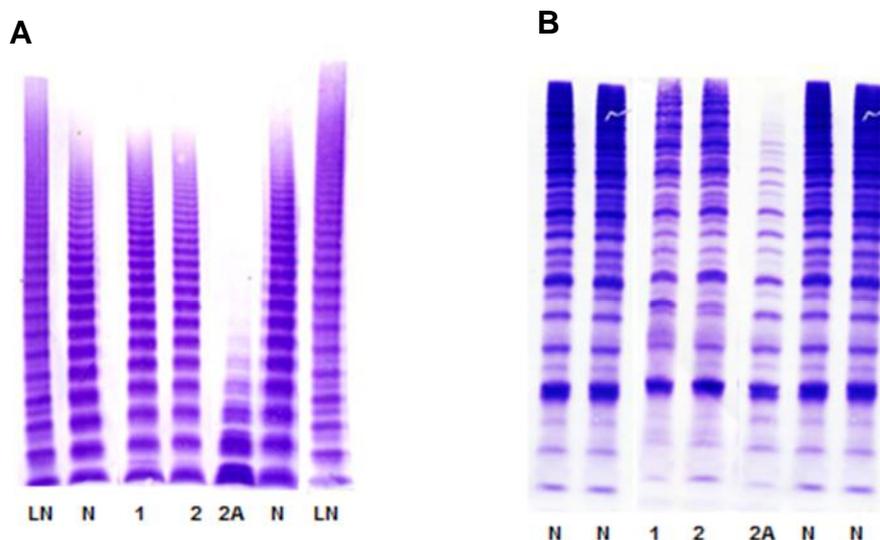
**Figura 10. Análisis multimérico del FVIII plasmático en pacientes con EVW 2A/2M. (A)** Gel de agarosa- SDS de baja resolución (1%). **(B)** Gel de agarosa-SDS de alta resolución (2%). En la figura se muestra una familia de seis miembros, todos clasificados como EVW tipo 2A/2M. LN = Lisado plaquetar normal; N = Plasma normal; 2A = control patológico de EVW 2A.

### 3.7 EVW TIPO 2N

Los 9 pacientes clasificados como tipo 2N (1,9%) no mostraron ninguna alteración multimérica, tanto en geles de baja como alta resolución (Figura 11). Todos ellos presentaban una razón FVIII:C/FVIII:Ag < 0,5%.

A nivel genético, todos ellos presentaban mutaciones descritas previamente como causantes de EVW tipo 2N. Dado que este tipo de enfermedad se hereda de forma recesiva es necesario que la mutación se presente en homocigosis (5 sujetos) o que una mutación en heterocigosis se encuentre asociada a un alelo nulo (dobles heterocigotos) (4 sujetos).

Cuando estas mutaciones se presentan en heterocigosis (alelo afecto y alelo normal), se consideran que los pacientes son portadores de EVW tipo 2N (n = 11). Los valores de las restantes pruebas fenotípicas se encuentran resumidos en la Tabla 3. La estructura multimérica de estos pacientes también sigue un patrón semejante a los controles normales (Figura 11).



**Figura 11. Análisis multimérico del FvW plasmático en pacientes con EVW 2N y portadores de EVW 2N.** El paciente 1, con EVW tipo 2N, y el paciente 2, portador de EVW 2N, presentan un patrón multimérico semejante a los controles normales. LN = Lisado plaquetar normal; N= Plasma normal; 2A = control patológico de EVW 2A

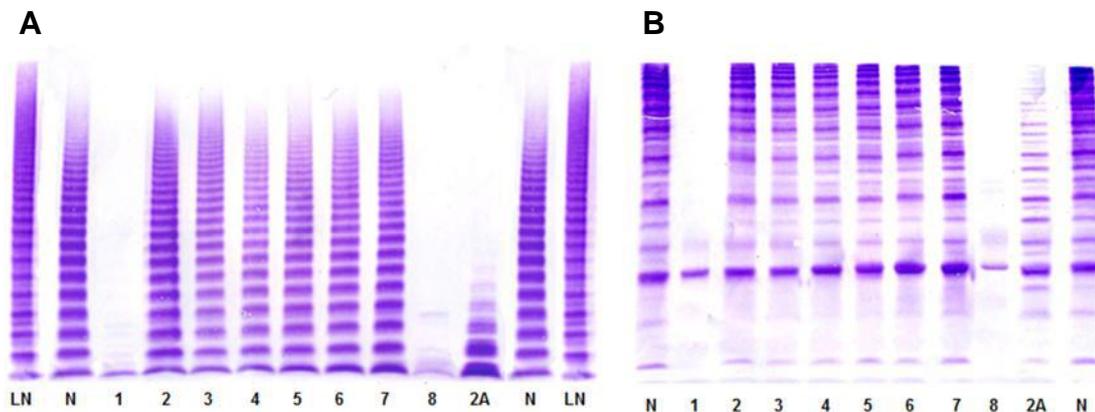
### 3.8 EVW TIPO 3

Se diagnosticaron un total de 42 pacientes con EVW tipo 3 (8,7%). Estos pacientes se caracterizan por una ausencia prácticamente total de la proteína plasmática del FvW (FvW:Ag < 3%), por lo tanto presentan un análisis de su estructura multimérica con ausencia de todos los multiméros, tanto en el estudio de geles de baja resolución como de alta

resolución (Figura 12). Los valores de los restantes datos de laboratorio se muestran en la Tabla 4.

Mutaciones de cambio de sentido, sin sentido o de “*splicing*” son las responsables de este fenotipo cuantitativo grave. Dado que esta variante de EVW se caracteriza por una herencia autosómica recesiva es necesaria la presencia de estas mutaciones en estado de homocigosis o doble heterocigosis, afectando a ambos alelos.

Treinta familiares de estos pacientes con EVW tipo 3 presentan tras el estudio genético una mutación en heterocigosis descrita como tipo 3. Por lo que estos pacientes son considerados como portadores de EVW tipo 3. A pesar de la alteración genética de uno de los alelos del *FVW*, los datos clínicos fenotípicos presentan valores dentro del rango de la normalidad (Tabla 3) y su estructura multimérica es semejante a la de los sujetos normales (Figura12).



**Figura 12. Análisis multimérico del FVW plasmático en pacientes con EVW tipo 3 y portadores tipo 3.** Los paciente 1 y 8, con EVW tipo 3, presentan una ausencia total de todos los multímeros, en la figura A y B. Los pacientes 2-7 son portadores de EVW tipo 3, familiares del paciente 1. Su estructura multimérica es similar a los sujetos normales, tanto en geles de baja (A) como alta (B) resolución. LN = Lisado plaquetar normal; N= Plasma normal; 2A = control patológico de EVW 2A

### 3.9 PACIENTES SIN CLASIFICAR

Un grupo de 16 sujetos fueron diagnosticados como pacientes con EVW pero no fue posible incluirlos en ningún tipo a la espera de ampliar el estudio. Nueve presentaban tanto un perfil multimérico, en geles de baja y

alta resolución, como las restantes pruebas fenotípicas dentro del rango de normalidad (Tabla 3). Sin embargo presentaron alguna mutación no descrita en el *FVW*. Los 7 pacientes restantes presentaron una estructura multimérica propia de pacientes con EVW tipo 2A o 2B, con pérdida de MAPM en geles de baja resolución y aumento en la proporción relativa de bandas satélites en geles de alta, así como los restantes datos de las pruebas fenotípicas (Tabla 4). La presencia de mutaciones no descritas previamente y la no realización de la prueba RIPA en los hospitales locales imposibilitan la distinción de estos pacientes como tipo 2A o tipo 2B.

Tabla 3. Valores medios  $\pm$  desviación estándar y rango de normalidad de los datos de laboratorio con patrón multimérico normal

	1 (n= 127)	1H (n=22)	2B (n = 5)	2M (n= 38)	2N (n = 9)	Portadores 3 (n = 30)	Portadores 2N (n = 11)	Sin clasificar (n= 9)	Rango Normal
<b>Multimérico</b>	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>BS (puntos)</b>	8,9 $\pm$ 10,5	5,9 $\pm$ 8,7	5,4 $\pm$ 6,3	7,6 $\pm$ 5,7	7,7 $\pm$ 2,5	1,5 $\pm$ 2,6	0,9 $\pm$ 1,6	0,7 $\pm$ 1,73	<b>&lt; 3 (H)/ &lt;5 (M)*</b>
<b>FVIII:C (%)</b>	38,8 $\pm$ 23,5	62,8 $\pm$ 18,6	63,6 $\pm$ 30,3	49,6 $\pm$ 35,4	13,1 $\pm$ 8,9	93,0 $\pm$ 28,7	81,4 $\pm$ 31,6	69,6 $\pm$ 26,1	<b>101,7 <math>\pm</math> 27,2</b>
<b>FVW:Ag (%)</b>	19,1 $\pm$ 11,9	54,6 $\pm$ 34,0	47,0 $\pm$ 14,6	38,9 $\pm$ 44,5	83,4 $\pm$ 77,2	56,9 $\pm$ 23,8	69,7 $\pm$ 23,4	56,8 $\pm$ 31,4	<b>101,4 <math>\pm</math> 35,3</b>
<b>FVW:RCo (%)</b>	21,4 $\pm$ 11,5	49,9 $\pm$ 19,7	49,6 $\pm$ 31,8	23,2 $\pm$ 33,6	82,9 $\pm$ 45,4	58,2 $\pm$ 17,6	89,9 $\pm$ 28,2	58,8 $\pm$ 31,5	<b>99,0 <math>\pm</math> 33,6</b>
<b>FVW:CB (%)</b>	17,8 $\pm$ 11,2	44,3 $\pm$ 21,8	37,0 $\pm$ 16,8	27,7 $\pm$ 28,5	80,1 $\pm$ 75,0	48,7 $\pm$ 15,4	74,5 $\pm$ 25,1	51,0 $\pm$ 26,6	<b>109,1 <math>\pm</math> 46,5</b>
<b>RCo/Ag</b>	1,2 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,5	0,5 $\pm$ 0,4	1,2 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,2	1,06 $\pm$ 0,2	<b>0,9 <math>\pm</math> 0,1</b>
<b>CB/Ag</b>	0,9 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,2	<b>1,1 <math>\pm</math> 0,2</b>
<b>FVIII:C/Ag</b>	2,2 $\pm$ 1,1	1,4 $\pm$ 0,8	1,3 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,9	0,3 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,7	1,2 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,8	<b>1,1 <math>\pm</math> 0,2</b>

N = normal; H = hombres; M = mujeres

Tabla 4. Valores medios  $\pm$  desviación estándar y rango de normalidad de los datos de laboratorio con patrón multimérico anormal

	<b>1</b> <b>(n = 6)</b>	<b>2A</b> <b>(n = 110)</b>	<b>2B</b> <b>(n = 30)</b>	<b>2A/2M</b> <b>(n = 34)</b>	<b>3</b> <b>(n = 42)</b>	<b>Sin clasificar</b> <b>(n = 7)</b>	<b>Rango Normal</b>
<b>Multimérico</b>	<i>Smear</i>	↓MAPM	↓MAPM	<i>Smear</i>	ATM	↓MAPM	<b>N</b>
<b>BS (puntos)</b>	6,0 $\pm$ 5,1	9,8 $\pm$ 4,9	11,2 $\pm$ 5,8	10,1 $\pm$ 4,9	12,0 $\pm$ 7,3	8,5 $\pm$ 5,9	<b>&lt; 3 (H)/ &lt;5 (M)*</b>
<b>FVIII:C (%)</b>	42,0 $\pm$ 12,5	36,7 $\pm$ 19,8	48,5 $\pm$ 22,9	32,9 $\pm$ 11,2	4,9 $\pm$ 3,4	44,3 $\pm$ 13,9	<b>101,7 <math>\pm</math> 27,2</b>
<b>FVW:Ag (%)</b>	19,4 $\pm$ 16,0	29,8 $\pm$ 18,6	43,1 $\pm$ 25,7	23,0 $\pm$ 14,3	1,2 $\pm$ 1,3	35,1 $\pm$ 13,1	<b>101,4 <math>\pm</math> 35,3</b>
<b>FVW:RCo (%)</b>	19,9 $\pm$ 13,07	8,0 $\pm$ 7,7	22,3 $\pm$ 12,9	12,1 $\pm$ 14,6	1,2 $\pm$ 0,9	15,7 $\pm$ 9,1	<b>99,0 <math>\pm</math> 33,6</b>
<b>FVW:CB (%)</b>	15,1 $\pm$ 13,2	12,9 $\pm$ 7,8	21,6 $\pm$ 14,8	15,2 $\pm$ 6,9	0,8 $\pm$ 0,9	16,4 $\pm$ 7,2	<b>109,1 <math>\pm</math> 46,5</b>
<b>RCo/Ag</b>	1,1 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,6	0,4 $\pm$ 0,2	<b>0,9 <math>\pm</math> 0,1</b>
<b>CB/Ag</b>	0,7 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,1	<b>1,1 <math>\pm</math> 0,2</b>
<b>FVIII:C/Ag</b>	2,9 $\pm$ 1,3	1,5 $\pm$ 0,7	1,3 $\pm$ 0,5	1,7 $\pm$ 0,7	4,2 $\pm$ 0,9	1,3 $\pm$ 0,4	<b>1,1 <math>\pm</math> 0,2</b>

↓MAPM = disminución de multímeros de alto peso molecular; ATM = ausencia de todos los multímeros; N = normal; H = hombres; M = mujeres

### 3.10 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

Para el estudio de la capacidad predictiva de esta prueba diagnóstica, se contrasta el resultado del análisis multimérico con el diagnóstico final de los 480 pacientes considerados con EVW.

Tabla 5. Cuadro sobre el estudio de la capacidad predictiva del análisis multimérico

		DIAGNÓSTICO FINAL		
		EVW con anomalías estructurales	EVW sin anomalías estructurales	Total
ANÁLISIS MULTIMÉRICO	Anormal	223	6	229
	Normal	5	246	251
	Total	228	252	480

Sensibilidad = 97,81%  
 Especificidad = 97,62%  
 Valor predictivo positivo = 97,38%  
 Valor predictivo negativo = 98,01%

Como se puede observar en la Tabla 5, tanto la sensibilidad como la especificidad de esta prueba son muy altas, superior al 97% en ambos casos. La probabilidad de padecer algún tipo de EVW con alteración cualitativa si el análisis multimérico es anormal es del 97,38% (valor predictivo positivo) mientras que la probabilidad de padecer algún tipo de EVW sin alteración en la estructura del FVW cuando el resultado del análisis multimérico es normal es del 98,01% (valor predictivo negativo).

### 3.11 RELACIÓN ENTRE EL PATRÓN MULTIMÉRICO Y EL BS Y LAS RAZONES ACTIVIDAD/Ag

El *BS* medio cuando el patrón multimérico del FVW es normal era 7,06 mientras que la media en el patrón multimérico anormal era 9,98.

Al realizar la prueba *t* de Student para comparar si estas medias eran estadísticamente distintas, obtuvimos un estadístico  $t = 4,23$  y un *p*-valor =

1.416e-05. A un nivel de significación del 5%, resulta un contraste significativo por lo que existe evidencia estadística de que la presencia de alteraciones cualitativas en la molécula del FVW concluyen en una sintomatología de sangrado más elevada.

En cuanto a la razón FVW:RCo/FVW:Ag, la media para el grupo de patrones multiméricos normales era 1,07 mientras que para los patrones anormales era 0,43. Con un p-valor  $< 2,2e-16$ , la prueba *t* de Student indicó que ésta diferencia resulta estadísticamente significativa a cualquier nivel de significación. La media de la razón FVW:CB/FVW:Ag para el grupo de los multiméricos normales fue 0,92 mientras que para multiméricos alterados fue 0,56. Aunque esta diferencia es menor a la observada con la razón anterior, la diferencia de estas medias resulta significativa a cualquier nivel de significación (p-valor  $< 2,2e-16$ ). Por lo que existe una relación entre el patrón multimérico y las razones RCo/Ag y CB/Ag, siendo ambas razones inferiores a 0,6 cuando el perfil multimérico del FVW se ve alterado.

Con el análisis de las varianzas (ANOVA) se estudió la posible existencia de diferencias significativas entre las medias de ambas razones en función de las distintas anormalidades multiméricas observadas (*smear*, ↓MAPM y ATM).

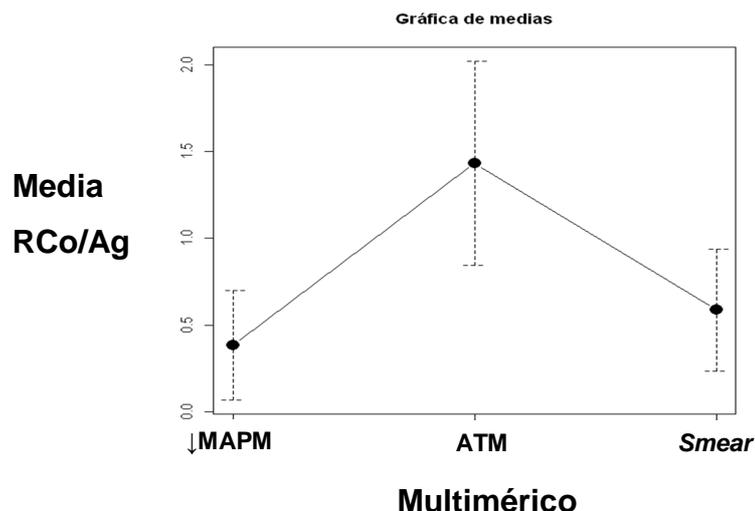


Figura 13. Gráfica de medias de la razón FVW:RCo/FVW:Ag en función de las distintas anormalidades multiméricas

En el gráfico anterior (Figura 13) podemos observar que las medias muestrales de la razón FVW:RCo/FVW:Ag fueron bastante diferentes en función del defecto multimérico observado, sin embargo, las desviaciones estándar de los grupos fueron relativamente grandes. La media y desviación estándar de esta razón para los diferentes perfiles multiméricos se resume en la siguiente tabla (Tabla 6):

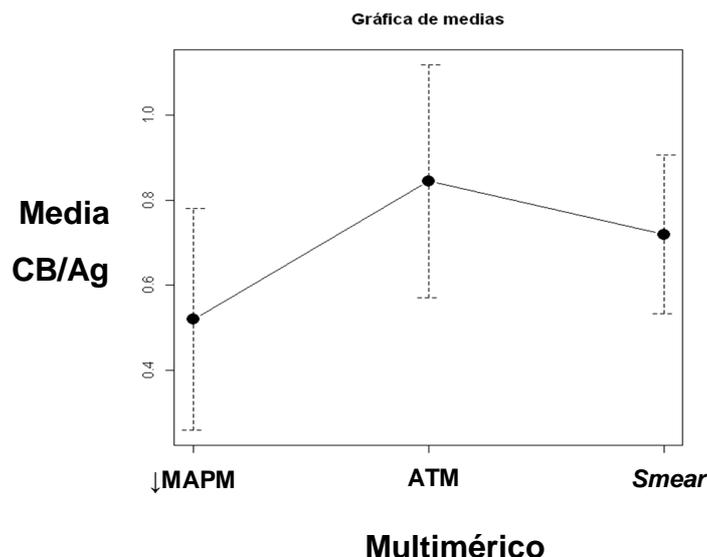
**Tabla 6. Media y desviación estándar de la razón FVW:RCo/FVW:Ag en función del perfil multimérico**

<b>Multimérico</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DE</b>	<b>n</b>
<b>↓MAPM</b>	0,38	0,32	140
<b>ATM</b>	1,43	0,59	42
<b>Smear</b>	0,59	0,35	40

El test ANOVA proporcionó un estadístico  $F = 117$  y un  $p$ -valor  $< 2e-16$ . Para cualquier nivel de significación razonable (0,05), el contraste ANOVA es altamente significativo, es decir, los datos evidencian diferencias significativas en la razón FVW:RCo/FVW:Ag entre los distintos perfiles multiméricos.

Con la prueba DSH de Tukey se compararon las medias dos a dos. El  $p$ -valor para cada contraste resultó inferior a 0,05, por lo que a un nivel de significación del 5%, los tres contrastes resultaron significativos, es decir, cada patrón multimérico anormal presentó una razón FVW:RCo/FVW:Ag estadísticamente diferente.

Las medias muestrales de la razón FVW:CB/FVW:Ag fueron bastante diferentes en función de los distintos perfiles multiméricos anormales, sin embargo, las desviaciones estándar de los grupos fueron bastante grandes, como se puede observar en la Figura 14. La media y desviación estándar de esta razón para los diferentes perfiles multiméricos se resume en la Tabla 7.



**Figura 14. Gráfica de medias de la razón FVW:CB/FVW:Ag en función del patrón multimérico**

El test ANOVA proporcionó un estadístico  $F = 30,65$  y un  $p\text{-valor} = 1,86e-12$ . Para cualquier nivel de significación razonable (0,05), el contraste ANOVA fue altamente significativo, es decir, los datos evidencian diferencias significativas en la razón FVW:CB/FVW:Ag entre los distintos perfiles multiméricos.

**Tabla 7. Media y desviación estándar de la razón FVW:CB/FVW:Ag en función del perfil multimérico**

Multimérico	MEDIA	DE	n
MAPM	0,52	0,26	140
ATM	0,84	0,27	42
Smear	0,72	0,19	40

Con la prueba DSH de Tukey se compararon las medias dos a dos. El  $p\text{-valor}$  resultó inferior a 0,05 en los contrastes excepto entre los multiméricos ATM y “smear”, por lo que a un nivel de significación del 5%, este contraste no resultó significativo, es decir, que la razón FVW:CB/FVW:Ag no mostró diferencias significativas entre una ausencia total de multímeros y un patrón en “smear” pero sí entre el patrón en “smear” y una pérdida de multímeros y entre la ausencia total de multímeros y una pérdida parcial.

## 4. DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio fue analizar la estructura multimérica de los pacientes reclutados en el proyecto PCM-EVW-ES. Nunca antes se había realizado un estudio similar en una cohorte de pacientes tan amplia. Los 480 pacientes diagnosticados finalmente de EVW fueron clasificados en los distintos subtipos de la EVW de acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas fenotípicas, entre las que se incluye el análisis multimérico, y el estudio genético. Estas subdivisiones no siempre pueden ser de relevancia clínica en cuanto a fines de diagnóstico. Sin embargo, las subdivisiones facilitan la comprensión de la alteración de los procesos fisiopatológicos en casos anormales de FVW y en muchos permiten realizar predicciones del tipo de mutación y su ubicación en el FVW.

En cuanto al análisis multimérico, 251 pacientes presentaron una estructura multimérica normal del FVW, al igual que los 39 sujetos sanos utilizados como controles normales, frente a los 229 pacientes restantes que presentaron alguna alteración multimérica en su estructura.

Todos los 155 pacientes clasificados como EVW tipo 1, presentaron razones FVW:RCo/FVW:Ag y FVW:CB/FVW:Ag superiores a 0,7. Sin embargo, gracias al análisis multimérico en 6 de ellos se encontró una anomalía en la estructura de la molécula del FVW, presentando un patrón en “*smear*”. De acuerdo con la clasificación de la EVW del año 1994,<sup>33</sup> la cual era muy estricta en cuanto a que anomalías cualitativas no deben estar presentes en pacientes tipo 1, estos pacientes serían considerados como EVW tipo 2 por su alteración multimérica. La actualización de la clasificación en 2006,<sup>32</sup> utiliza una definición de la EVW tipo 1 más flexible permitiendo la inclusión de anomalías cualitativas, siempre y cuando no interfieran con una funcionalidad normal y permitan el tratamiento exitoso con desmopresina. Así, siguiendo con la nomenclatura de la bibliografía existente,<sup>41,42</sup> estos pacientes fueron considerados como EVW tipo 1 *smear*.

Veintidós pacientes tipo 1 con multimérico normal fueron subclasificados como EVW tipo 1H. Varios estudios llevados a cabo sobre el aumento de los niveles de los factores hemostáticos con la edad<sup>43,44</sup> demuestran un aumento de los niveles de FVW y FVIII en pacientes con EVW tipo 1 en función de la edad pero sin mitigación en el fenotipo de sangrado. Así, en pacientes tipo 1, el FVW puede llegar a normalizarse con el envejecimiento.

Los tipos 2A y 2B de la EVW se caracterizan por ser variantes cualitativas de esta enfermedad en la que se observan principalmente anomalías en la estructura multimérica del FVW. En el caso de la EVW 2A, gracias a la técnica del multimérico se puede distinguir entre los distintos subtipos en función del grado de proteólisis de la molécula del FVW en geles de alta resolución (2A/IIE y 2A/IID). Los 5 pacientes con EVW tipo 2B y patrón multimérico normal, ya fueron descritos anteriormente por Holmberg et al en 1993, a los que clasificó como tipo 2B Malmö.<sup>45</sup> Inicialmente este tipo de pacientes fueron considerados como tipo 1 New York por su patrón multimérico normal sin embargo deben ser considerados como tipo 2 al ser una variante funcional del FVW debidos a un aumento en la afinidad del FVW por la Gplb plaquetar.

Un grupo de 34 pacientes presentaron datos fenotípicos típicos de la EVW tipo 2A (FVW:RCo/FVW:Ag y FVW:CB/FVW:Ag < 0,7). Este tipo de EVW está asociado a una disminución de MAPM. Sin embargo, el perfil multimérico que encontramos en estos pacientes presentan todos los multímeros pero con patrón en "smear". Por eso estos pacientes fueron clasificados como tipo 2A/2M. Una de las debilidades de la presente clasificación es que no hay ninguna recomendación para tipos en los que dos diferentes alteraciones fenotípicas están presentes en un determinado paciente asociado con una única mutación. Esta debilidad ya fue puesta de manifiesto anteriormente asociada a la mutación p.R1374C.<sup>46,47</sup> En este estudio además de esta mutación se encontraron otras alteraciones nucleotídicas asociadas a estos pacientes (p.R1315Cy p.R763S y p.C2491R).

La sensibilidad y especificidad estudiada en esta cohorte de pacientes a la hora de discernir variantes cuantitativas y cualitativas es muy alta, siendo superiores al 97%. Es por esto que para algunos autores el análisis multimérico es considerado el “Gold standard” en el diagnóstico de la EVW.<sup>48</sup>

En cuanto a la relación entre la estructura multimérica del FVW y la puntuación hemorrágica, observamos estadísticamente que existe una diferencia significativa entre la puntuación hemorrágica de los pacientes con un perfil multimérico normal y los que presentan alguna alteración en su estructura, presentando estos últimos una sintomatología hemorrágica mayor. Las anormalidades multiméricas observadas generalmente están relacionadas con la pérdida, disminución o difuminación de los MAPM, que son los multímeros hemostáticamente más efectivos, por lo que la molécula de FVW estructuralmente alterada no puede realizar correctamente sus funciones en la hemostasia.

Ciertos autores consideran que la técnica del análisis multimérico puede ser sustituido por las razones de FVW:RCo/FVW:Ag y FVW:CB/FVW:Ag. Esto puede estar apoyado por las diferencias estadísticamente significativas en la medias de ambas razones en cuanto al perfil multimérico. Sin embargo, y como ya se ha comentado anteriormente, existen casos en los que nos encontramos con razones  $> 0,7$  pero multimérico anormal (ej. EVW tipo 1 “*smearly*”) y otros en los que la estructura multimérica no se corresponde con la esperada según la clasificación actual (ej. EVW tipo 2A/2M). Por lo que es necesario la aplicación de todas estas pruebas diagnósticas para una correcta clasificación y diagnóstico de la EVW.

## **5. CONCLUSIONES**

1. La enfermedad de von Willebrand es un complejo trastorno hemorrágico cuya identificación sigue siendo un reto debido a la

variabilidad clínica y al amplio panel de pruebas de laboratorio requeridas para diagnosticar y definir con precisión la enfermedad.

2. Anormalidades multiméricas muy sutiles pueden ser de limitada relevancia clínica, pero la identificación del subtipo de EVW permite identificar los mecanismos fisiopatológicos alterados y así mejorar el tratamiento y bienestar de los pacientes con EVW.
3. Los resultados de este estudio refuerzan el papel y la importancia del análisis multimérico para el diagnóstico de la EVW, con una sensibilidad y especificidad para determinar variantes cualitativas superior al 97%. Aunque dada la complejidad de esta metodología debe llevarse a cabo su simplificación y mejor estandarización.

## **6. AGRADECIMIENTOS**

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han colaborado en la realización de este proyecto, en especial al grupo de Investigación de Hematología y Hemoterapia del INIBIC, dirigido por la Dra. M<sup>a</sup> Fernanda López Fernández.

En primer lugar, agradecer a mis directoras, la Dra. M<sup>a</sup> Fernanda López Fernández y la Dra. Almudena Pérez Rodríguez, por sus consejos, paciencia y dedicación en el buen desarrollo de este estudio.

A mis compañer@s del laboratorio, especialmente a Esther Lourés, José Luís Núñez y Joana Costa por todos estos años de trabajo mano a mano, compartiendo risas y experiencias.

Y, por último, aunque no menos importante, al Dr. Batlle, el motor de este proyecto. Por las enseñanzas recibidas y el apoyo prestado durante este tiempo.

**Gracias a todos.**

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. von Willebrand EA. Hereditary pseudohefemofili. *Finska Lakaresallskapets Handlingar* 1926; 67: 7-112.
2. Von Willebrand EA. Ueber hereditaere Pseudohaemophilie. *Acta Med Scand.* 1931; 76: 521-50.
3. Nilsson IM, Blombäck M, Von Francken I. On an inherited autosomal hemorrhagic diathesis with antihemophilic globulin (AHG) deficiency and prolonged bleeding time. *Acta Med Scand.* 1957; 159 (1): 35-7.
4. Shapiro GA, Andersen JC, Pizzo SV, McKee PA. The subunit structure of normal and hemophilic factor VIII. *J Clin Invest* 1973; 52: 2198-2210.
5. Holmberg L, Nilsson IM. Genetic variants of von Willebrand's disease. *Br Med. J.* 1972; 3(5822): 317-20.
6. Peake IR, Bloom AL, Giddings JC. Inherited variants of factor-VIII-related protein in von Willebrand's disease. *N Engl J Med.* 1974; 291(3): 113-7.
7. Ginsburg D, Bowie EJ. Molecular genetics of von Willebrand disease. *Blood.* 1992; 79: 2507-19.
8. Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Worrall NK, Shelton-Inloes BB, Socace JM, et al. Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 1989; 264: 19514-27.
9. Montgomery R, Haberichter S. Von Willebrand factor structure and function. En: Federici A, Lee C, Berntorp E, Lilicrap D, Montgomery R. Von Willebrand disease. Basic and clinical aspects. Oxford: Wiley-Blackwell; 2011: pp. 30-48.
10. Abildgaard CF, Suzuki Z, Harrison J, Jefcoat K, Zimmerman TS. Serial studies in von Willebrand's disease: variability versus "variants". *Blood.* 1980; 56: 712-6.
11. Wagner DD, Marder VJ. Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells: processing steps and their intracellular localization. *J Cell Biol.* 1984; 99: 2123-30.

12. Sporn LA, Chavin SI, Marder VJ, Wagner DD. Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. *J Clin Invest.* 1985; 76: 1102-6.
13. Wagner DD, Lawrence SO, Ohlsson-Wilhelm BM, Fay PJ, Marder VJ. Topology and order of formation of interchain disulfide bonds in von Willebrand factor. *Blood.* 1987; 69: 27-32.
14. Fretto LJ, Fowler WE, McCaslin DR, Erickson HP, McKee PA. Substructure of human von Willebrand factor. Proteolysis by V8 and characterization of two functional domains. *J Biol Chem.* 1986; 261: 15679-89.
15. Verweij CL, Hart M, Pannekoek H. Von Willebrand factor (VWF) pro-polyptide is required for VWF multimer formation. *Thrombosis Haemostasis.* 1987; 58: 8a.
16. Fujimura Y, Titani K, Holland LZ, Roberts JR, Kostel P, Ruggeri ZM, et al. A heparin-binding domain of human von Willebrand factor. Characterization and localization to a tryptic fragment extending from amino acid residue Val-449 to Lys-728. *J Biol Chem.* 1987; 262: 1734-9.
17. Mohri H, Yoshioka A, Zimmerman TS, Ruggeri ZM. Isolation of the von Willebrand factor domain interacting with platelet glycoprotein Ib, heparin, and collagen, and characterization of its three distinct functional sites. *J Biol Chem.* 1989; 264: 17361-7.
18. Ruggeri ZM and Ware J. The structure and function of von Willebrand factor. *Thromb Haemost.* 1992; 67: 594-599.
19. Fujimura y, Holland LZ, Ruggeri ZM, Zimmerman TS. The von Willebrand factor domain mediating botrocetin-induced binding to glycoprotein Ib lies between Val449 and Lys728. *Blood.* 1987; 70: 985-8.
20. Wang JW, Valentijn KM, de Boer HC, Dirven RJ, van ZonneveldAJ, Koster AJ, et al. Intracellular storage and regulated secretion of von Willebrand factor in quantitative von Willebrand disease. *J Biol Chem.* 2011; 286: 24180-8.

21. Reininger AJ. Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis. *Haemophilia*. 2008; 14 (Suppl 5):11-26.
22. Tsai HM. Shear stress and von Willebrand factor in health and disease. *Semin Thromb Hemost*. 2003; 29: 479-488.
23. Moake JL. von Willebrand factor, ADAMTS-13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol*. 2004; 41: 4-14.
24. Springer TA. Biology and physics of von Willebrand factor concatamers. *J Thromb Haemost*. 2011; 9 (Suppl 1):130-43.
25. James PD, Goodeve AC. Von Willebrand disease. *Genet Med*. 2011; 13: 365-76.
26. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 395-424.
27. Batlle J, Pérez Rodríguez A, López Fernández MF. Enfermedad de von Willebrand. En: Jiménez-Yuste V. Atlas de hemofilia. 4ª ed Salerno: Momento Medico; 2013: pp. 245-66.
28. James AH. Von Willebrand disease in women: awareness and diagnosis. *Thromb Res*. 2009; 124(Suppl 1): S7-10.
29. Govorov I, Ekelund L, Chaireti R, Elfvinge P, Holmström M, Bremme K, et al. Heavy menstrual bleeding and health-associated quality of life in women with von Willebrand's disease. *Exp Ther Med*. 2016; 11(5): 1923-9.
30. Batlle J, Pérez-Rodríguez A, Costa Pinto J, Lourés Fraga E, Rodríguez Trillo A, López Fernández MF on behalf of participant investigators and centers. Diagnosis and management of von Willebrand disease in Spain. *Semin Thromb Hemost*. 2011; 37(5): 503-10.
31. Rodeghiero F, Castaman G. Von Willebrand disease: epidemiology. In: Lee CA, Berntorp EE, Hoots WK, eds. *Textbook of Hemophilia*. Oxford, United Kingdom: Blackwell; 2005: pp. 265–72.
32. Sadler JE, Budde U, Eikenboom J, Favaloro EJ, Hill FG, Holmberg L, et al. Update on the pathophysiology and classification of von

- Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost.* 2006; 4(10): 2103-14.
33. Sadler JE. A revised classification of von Willebrand disease. For the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost.* 1994; 71(4): 520–5.
  34. Tosetto A, Rodeghiero F, Castaman G, Goodeve A, Federici AB, Batlle J, et al. A quantitative analysis of bleeding symptoms in type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study (MCMDM-1 VWD). *J Thromb Haemost* 2006; 4(4): 766–73.
  35. Budde U, Drewke E, Mainusch K, Schneppenheim R. Laboratory diagnosis of congenital von Willebrand disease. *Semin Thromb Hemost.* 2002; 28(2): 1003-7.
  36. Corrales I, Catarino S, Ayats J, Arteta D, Altisent C, Parra R, et al. High-throughput molecular diagnosis of von Willebrand disease by next generation sequencing methods. *Haematologica.* 2012; 97(7): 1003-7.
  37. Lillicrap D. von Willebrand disease: advances in pathogenetic understanding, diagnosis, and therapy. *Blood* 2013; 122: 3735–40.
  38. Batlle J, Pérez-Rodríguez A, Corrales I, López-Fernández MF, Rodríguez-Trillo A, Lourés E, et al. Molecular and clinical profile of von Willebrand disease in Spain (PCM-EVW-ES): Proposal for a new diagnostic paradigm. *Thromb Haemost.* 2016; 115(1):40-50.
  39. Ruggeri ZM and Zimmerman TS. The complex multimeric composition of FVIII/von Willebrand factor. *Blood* 1981; 57: 1140-3.
  40. Batlle J, López Fernández MF. Laboratory Assays for von Willebrand Factor. In *Coagulation and Bleeding Disorders: The role of Factor VIII and von Willebrand Factor.* Ed Marcel Dekker Inc New York. 1989: pp.325-342.
  41. Schneppenheim R, Marggraf O, Eckert K, Obser T, Oyen F, Pieconka A, et al. Molecular background of ‘smeary’ von Willebrand factor multimers. *Blood.* 2007; 110: 2711.

42. Michiels JJ, Berneman Z, Gadisseur A, van der Planken M, Schroyens W, van Vliet HH. Laboratory diagnosis and molecular basis of mild von Willebrand disease type 1. *Acta Haematol.* 2009; 121 (2-3): 85-97.
43. Sanders YV, Giezenaar MA, Laros-van Gorkom BA, Meijer K, Van der Bom JG, Nieziel MR, et al. von Willebrand disease and aging: an evolving phenotype. *J Thromb Haemost.* 2014; 12(7): 1066–1075.
44. Favaloro EJ, Franchini M, Lippi G. Aging hemostasis: changes to laboratory markers of hemostasis as we age - a narrative review. *Semin Thromb Hemost.* 2014; 40(6): 621-33.
45. Holmberg L, Dent JA, Schneppenheim R, Ulirsch B, Jerry W, Ruggeri ZM. von Willebrand factor mutation enhancing interaction with platelets in patients with normal multimeric structure. *J Clin Invest.* 1993; 91(5): 2169-77.
46. Penas N, Pérez-Rodríguez A, Torea JH, Lourés E, Noya MS, López-Fernández MF, Batlle J. von Willebrand disease R1374C: type 2A or 2M? A challenge to the revised classification. High frequency in the northwest of Spain (Galicia). *Am J Hematol.* 2005; 80(3): 188-96.
47. Batlle J, Perez-Rodriguez A, Franqueira MD, Lopez-Fernandez MF. Type 2M von Willebrand disease: a variant of type 2A? *J Thromb Haemost.* 2008; 6(2): 388-90
48. Budde U. Diagnosis of von Willebrand disease subtypes: implications for treatment. *Haemophilia.* 2008; 14 (Suppl 5): 27-38.

## 8. ANEXOS

### 8.1 ANEXO I. PUNTUACIÓN HEMORRÁGICA

PUNTUACIÓN HEMORRAGICA						
Síntoma	-1	0	1	2	3	4
<b>Epistaxis</b>	-	No o trivial (menos de 5)	> 5 o más de 10 min.	Solamente consulta	Presión local o cauterización o antifibrinolítico	Transfusión sanguínea o terapia sustitutiva o desmopresina
<b>Cutáneo</b>	-	No o trivial (< 1 cm)	> 1cm y no trauma	Solamente consulta		
<b>Sangrado de heridas menores</b>	-	No o trivial (menos de 5)	> 5 o más de 5 min.	Solamente consulta	Hemostasia quirúrgica	Transf. sang.o terapia sustitut., desmopresina
<b>Cavidad oral</b>	-	No	Referido al menos 1	Solamente consulta	Hemostasis quirúrgica o antifibrinolítica	Transf. sang.o terapia sustitut., desmopresina
<b>Sangrado gastrointestinal</b>	-	No	Asociada con úlcera, hipertensión portal, hemorroides, angiodisplasia	Espontáneo	Hemostasis quirúrgica, transf. sang., terapia sustitut., desmopresina antifibrinolítico	
<b>Extracción de dientes</b>	No sangrado en al menos 2 extracciones	Ningún hecho o ningún sangrado en 1 extrac.	Referido en < 25% de todos los procesos	Referido en > 25% de todos los procesos, no intervención	Resutura o presión local	Transfusión sanguínea o terapia sustitutiva o desmopresina

<b>PUNTUACIÓN HEMORRAGICA</b>						
<b>Síntoma</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Cirugía</b>	No sangrado en al menos 2 cirugías	Ningún hecho o sangrado en 1 cirugía	Referido en < 25% de todas las cirugías	Referido en > 25% de todos los procesos, no intervención	Hemostasia quirúrgica o antifibrinolítico	Transfusión sanguínea o terapia sustitutiva o desmopresina
<b>Menorragia</b>	-	No	Solamente consulta	Antifibrinolítico, uso de píldora	Legrado, terapia férrica	Transf. sang. o terapia substitut., desmopresina o hysterectomía
<b>Hemorragia post-parto</b>	No sangrado en al menos 2 partos	No partos o no sangrado en 1 parto	Solamente consulta	Legrado, terapia férrica o antifibrinolíticos	Transfusión sanguínea o terapia sustitutiva o desmopresina	Histerectomía
<b>Hematomas musculares</b>	-	Nunca	No terapia post-trauma	Espontáneo, no terapia	Espontáneo o traumático, requiere desmopresina o terapia sustitutiva	Espontáneo o traumático, requiere intervención quirúrgica o transfusión sang.
<b>Hemartrosis</b>	-	Nunca	No terapia post-trauma	Espontáneo, no terapia	Espontáneo o traumático, requiere desmopresina o terapia sustitutiva	Espontáneo o traumático, requiere intervención quirúrgica o transfusión sang.
<b>Sangrado SNC</b>	-	Nunca	-	-	Subdural, ninguna intervención	Intracerebral, ninguna intervención