



Universidad de la República
Licenciatura en Biología Humana



Trabajo de Pasantía de Grado

**Caracterización de variantes genéticas (patogénicas y benignas) de pacientes
con enfermedad de von Willebrand de Rivera, Uruguay**

Estudiante: Estefanía Chalela **Tutor:**

Yasser Vega

Orientador de Pasantía: Yasser Vega

Coorientador: Maximiliano Berro

Lugar de realización: Cenur Noreste, sede Rivera/Tacuarembó.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de este proceso entendí que una tesis no se trata solamente de horas de estudio, análisis, prácticas y lectura, sino que también requiere apoyo y contención del entorno. Debido a ello, es mi deseo agradecer a todas esas personas que formaron parte de este hermoso trayecto.

En primer lugar, a mi esposo y a mis familiares por su apoyo constante, por el cariño y la paciencia en días productivos, pero principalmente en jornadas que requirieron mayor esfuerzo.

A mi tutor, Yasser Vega, por dedicar su tiempo, por su enseñanza y guía en cada paso, por ayudarme a mejorar punto a punto este trabajo. Agradecer por cada intercambio, cada corrección y la gran oportunidad de aprendizaje.

A mi coorientador Maximiliano Berro, por su compromiso, su apoyo académico y su disponibilidad en el desarrollo del trabajo.

Agradezco a la Dra. Yanina Panzera, encargada de la Plataforma Genómica de Facultad de Ciencias, UdelaR, por brindarme la oportunidad de realizar las tareas prácticas en las instalaciones del laboratorio, por las horas dedicadas y por el aprendizaje durante este tiempo

En especial, agradezco a la coordinadora de carrera, Lic. Isabel Volz y a la Lic. Patricia Viera cuyo acompañamiento fue fundamental en un momento decisivo de mi formación. Su apoyo me permitió entablar el proyecto con el Prof. Yasser Vega.

Agradezco a mis amigos/as y compañeros/as por el apoyo, las charlas y los consejos a lo largo de todo el proceso; gracias por hacer que esta tarea se hiciera más liviana.

Finalmente, agradezco a todas las personas que de alguna forma han hecho parte de mi proceso de aprendizaje durante estos años; todos dejaron su huella en mi formación. A cada uno de ellos, gracias por contribuir a que este logro sea posible.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	2
Enfermedad de von Willebrand	2
Hemostasia y Factor de von Willebrand	3
Reseña histórica de la enfermedad de von Willebrand	3
Tipos de EVW:	4
EVW Tipo I	4
EVW Tipo II	4
EVW Tipo III	5
Bioquímica del factor de von Willebrand (FVW)	5
Genética de la EVW	6
Antecedentes sobre estudios genéticos en EVW	8
JUSTIFICACIÓN	11
OBJETIVOS	12
Objetivo General	12
Objetivos Específicos	12
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Muestra	12
Aspectos bioéticos	12
1- Preparación de las librerías genómicas	13
2- Chequeo de la calidad de las librerías	17
3- Secuenciación	17
4- Análisis bioinformático	17
RESULTADOS	18
Variantes patogénicas	19
Variantes polimórficas en regiones codificantes	20
Variantes polimórficas en intrones	22
DISCUSIÓN	25
CONCLUSIONES	32
BIBLIOGRAFÍA	33

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURAS

Figura 1. Estructura del factor von Willebrand y sus dominios funcionales.	6
Figura 2. Estructura del gen y la proteína de factor von Willebrand	7
Figura 3. Esquema de variantes patogénicas y benignas en regiones codificantes	18

TABLAS

Tabla 1. Variantes patogénicas detectadas en pacientes con EVW del noreste de Uruguay	19
Tabla 2. Variantes polimórficas de regiones codificantes	21
Tabla 3. Variantes polimórficas en regiones intrónicas (frecuentes)	23
Tabla 4. Variantes polimórficas en regiones intrónicas (únicas*)	24

RESUMEN

La enfermedad de von Willebrand (EVW) es uno de los trastornos hemorrágicos hereditarios más frecuentes en todas las poblaciones, el cual es causado por variantes patogénicas en el gen del Factor von Willebrand (FVW) que pueden causar defectos cuantitativos y/o cualitativos en dicho factor. La heterogeneidad clínica y, principalmente, genética del trastorno representa un desafío para el diagnóstico, especialmente cuando no existen estudios locales, como en Uruguay y, más específicamente, en el departamento de Rivera, donde no se han caracterizado genéticamente pacientes con la enfermedad.

El objetivo de esta investigación fue describir las variantes genéticas (patogénicas y benignas) presentes en pacientes con EVW de Rivera, Uruguay, con la finalidad de aportar al conocimiento sobre esta enfermedad, contribuyendo a mejorar su diagnóstico e identificación en esta población. En la metodología se empleó un panel de secuenciación masiva paralela, con un análisis bioinformático posterior, que permitió analizar la secuencia de las regiones codificantes del gen VWF y detectar variantes en dichas regiones, en las uniones intrón/exón y en los extremos 5' y 3' no traducidos. Las variantes detectadas se caracterizaron según su perfil genotípico.

Se identificaron tres variantes patogénicas asociadas a la enfermedad de von Willebrand; también se encontraron variantes polimórficas tanto en exones como en intrones. Se observó una mayor frecuencia de variantes en la zona de los dominios D'D3 y A1, lo que conocemos como "hotspot". Los resultados reflejan la importancia del análisis genético-molecular para optimizar el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand e incrementar el conocimiento sobre esta enfermedad, así como sobre el acervo genético del país.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Enfermedad de von Willebrand

La enfermedad de von Willebrand (EVW) es el trastorno hemorrágico hereditario más común en los seres humanos. Se produce por alteraciones cuantitativas del factor de von Willebrand (FVW) o por la presencia de formas anormales del factor en el torrente sanguíneo. Debido a que los síntomas a menudo son leves, una considerable mayoría de los pacientes permanece sin diagnóstico. No obstante, en todos los tipos de EVW los episodios hemorrágicos pueden ser graves y pueden requerir tratamiento, especialmente durante o después de cirugías o trabajos dentales. La enfermedad no muestra predilección geográfica o étnica, pero, aunque ambos sexos pueden heredar la enfermedad con igual frecuencia, las mujeres superan a los hombres aproximadamente 2:1 en la mayoría de las poblaciones presumiblemente por la carga de sangrado mucocutáneo excesivo en las mujeres en edad reproductiva (Lillicrap, D. 2013).

Los síntomas que con mayor frecuencia presentan los pacientes con EVW son: epistaxis recurrente, laceraciones con hemorragias prolongadas, propensión a los moretones, hemorragia gingival, menorragia, hemorragias prolongadas posteriores a intervenciones médicas, hemorragia abundante o prolongada después del parto, hematomas musculares y hemartrosis (Bloom, AL. 1991).

La EVW presenta una distribución mundial y también es común en otras especies animales, como los perros y los cerdos. Su prevalencia en la población humana varía según el enfoque utilizado para definir el diagnóstico. En dos grandes estudios epidemiológicos prospectivos se ha observado que hasta el 1% de una población predominantemente pediátrica presenta síntomas y signos de laboratorio de la EVW (Rodeghiero *et al.*, 1987; Werner *et al.*, 1993). En contraste, en diversos países se estima que la prevalencia de las manifestaciones más graves de la enfermedad (EVW tipo 3) es de entre 1 y 3 por millón (Bloom, AL. 1991).

Hemostasia y Factor de von Willebrand

La hemostasia es uno de los procesos más importantes del cuerpo. Es un mecanismo de defensa mediante el cual el cuerpo puede evitar el sangrado tras una lesión vascular, lo que protege de posibles hemorragias graves. Este proceso incluye etapas como la vasoconstricción, la formación de un tapón plaquetario y la activación de la cascada de coagulación. Entre las etapas de la hemostasia, el factor von Willebrand desempeña un papel importante en la formación del tapón plaquetario sobre la lesión vascular y también actúa como estabilizador del factor VIII en la cascada de coagulación (Ceresetto, JM. 2017; Sadler, JE. 1998).

Reseña histórica de la enfermedad de von Willebrand

La enfermedad de von Willebrand fue descrita por primera vez en 1926 por el médico Erik von Willebrand, de origen finlandés. Este médico identificó a una familia que presentaba síntomas, como episodios hemorrágicos; logró diferenciarla de algunas enfermedades, pero no llegó a un diagnóstico preciso. Von Willebrand pudo discriminar que no se trataba de un trastorno sanguíneo ya conocido, como la hemofilia, ya que la enfermedad que afectaba a esta familia se presentaba tanto en hombres como en mujeres (a diferencia de la hemofilia, que afecta con mayor frecuencia a hombres que a mujeres). Según la sintomatología, Von Willebrand denominó la enfermedad como pseudohemofilia hereditaria, ya que no logró determinar el factor responsable; notó una similitud con la hemofilia, pero la distinguió de esta (Favaloro, EJ. 2014).

El avance de las investigaciones posteriores a la descripción realizada por von Willebrand permitió descubrir que las personas con esa sintomatología presentaban una deficiencia del factor denominado factor von Willebrand, nombrado así en su honor, lo que permitió comprender el trastorno y lograr un mejor tratamiento para estos pacientes. Con el pasar de los años, las nuevas líneas de investigación han permitido el avance en el conocimiento sobre esta enfermedad, se ha logrado identificar su origen, así como su clasificación, lo cual permite que los diagnósticos sean cada vez más eficaces y precisos, esto tiene como consecuencia un mejor tratamiento a los que la padecen (Favaloro, EJ. 2014). Debido a esto,

es elemental que se continúe investigando para garantizar un diagnóstico minucioso y real, que permita tratar a los pacientes de forma más efectiva y mejore su calidad de vida.

Tipos de EVW:

Las recomendaciones oficiales de la Sociedad Internacional sobre Trombosis y Hemostasia proponen, para su clasificación, que la EVW se considere un rasgo, ya sea cuantitativo (tipos 1 y 3) o cualitativo (tipo 2).

EVW Tipo I

Esta es la forma más común de la EVW y representa cerca del 80% de los casos. Su herencia es autosómica dominante con penetración incompleta. La enfermedad tipo 1 se caracteriza por una reducción leve a moderada (0,45-0,05 U/mL) de las concentraciones plasmáticas de FVW. El FVW es normal desde el punto de vista funcional y la concentración plasmática de la actividad coagulante del factor VIII (FVIII:C) se reduce en proporción a la concentración de FVW. Los pacientes manifiestan un espectro de síntomas de hemorragias mucocutáneas, cuya gravedad, por lo general, está correlacionada con el nivel de deficiencia de FVW (Lillicrap & James 2009).

EVW Tipo II

La clasificación actual de la EVW reconoce cuatro tipos cualitativos: 2A, 2B, 2M y 2N. Las manifestaciones clínicas de las variantes del tipo 2 de la EVW son similares a las del tipo 1. La EVW tipo 2A se caracteriza por una pérdida de la función del FVW, dependiente de las plaquetas, debido a la ausencia de las formas de alto peso molecular de la proteína. EVW tipo 2B: este subtipo de la EVW representa un rasgo genético clásico de ganancia de función. Las variantes que producen la EVW tipo 2B incrementan la adherencia del FVW al receptor plaquetario de la glicoproteína Ib y provocan interacciones espontáneas entre el FVW y las plaquetas en el torrente sanguíneo, fenómeno que no ocurre con el FVW normal. Como resultado de las interacciones plaquetarias anormales, estos pacientes a menudo presentan

trombocitopenia leve a moderada. El subtipo 2M se caracteriza por la pérdida de función equivalente a la del tipo 2B de la enfermedad. El tipo 2N se hereda como rasgo autosómico recesivo, causado por variantes en el sitio de unión del factor VIII (Lillicrap & James 2009).

EVW Tipo III

La EVW tipo 3 se hereda como rasgo autosómico recesivo y la mayoría de los padres de pacientes con enfermedad tipo 3 presentan pocos o ninguno de los síntomas hemorrágicos. En la enfermedad tipo 3, las concentraciones de FVW siempre son inferiores a 0,05 U/mL y, con frecuencia, indetectables. Estos pacientes presentan graves hemorragias mucocutáneas recurrentes, así como hemorragias musculoesqueléticas y en tejidos blandos frecuentes. (Lillicrap & James 2009).

Bioquímica del factor de von Willebrand (FVW)

El FVW se sintetiza en las células endoteliales y en los megacariocitos como una preproteína de 2.813 aminoácidos. Se dimeriza y somete a una extensa modificación postraduccional que la convierte en una proteína madura en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales y en los gránulos alfa de las plaquetas. Se sintetiza con un péptido señal de 22 aminoácidos, un propéptido de 741 aminoácidos y el FVW maduro de 2050 aminoácidos (Goodeve, AC. 2010).

El FVW actúa como una proteína adhesiva que se une a varios ligandos (figura 1), componentes esenciales del proceso hemostático. El FVW se une a:

- 1- las plaquetas y al subendotelio, a fin de fomentar la adhesión plaquetaria,
- 2- a las plaquetas activadas, a fin de fomentar la agregación plaquetaria y al factor VIII de la coagulación, para evitar su degradación prematura (Lillicrap & James 2009).

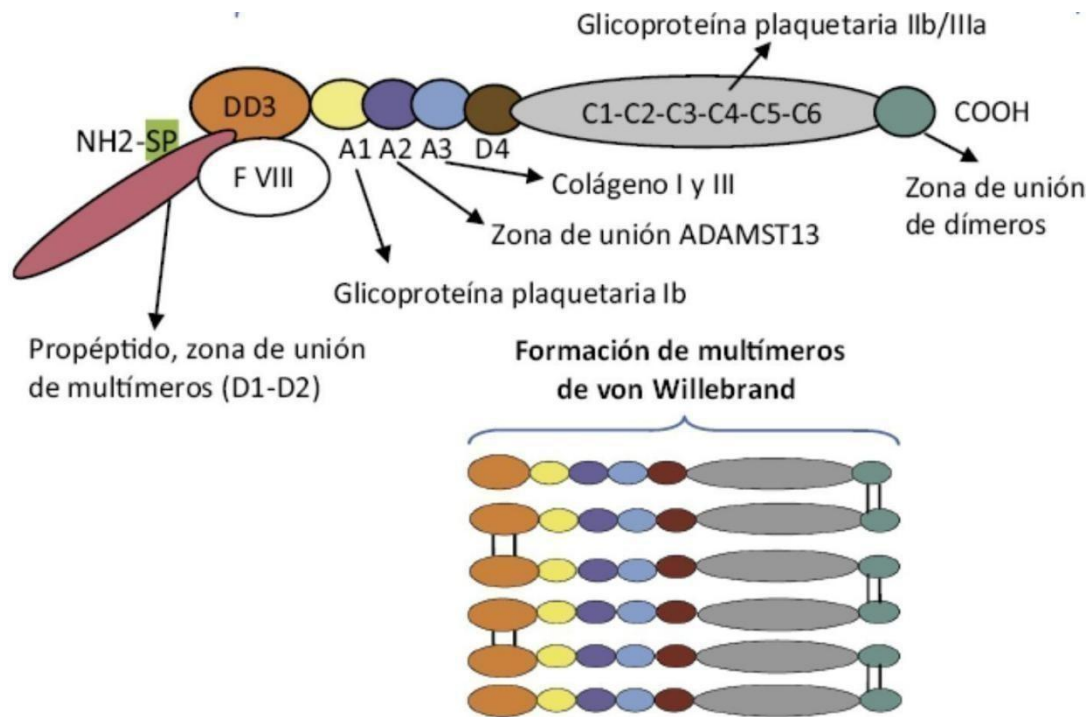


Figura 1. Estructura del factor von Willebrand y sus dominios funcionales.

(Tomado de: González *et al.*, 2021)

Genética de la EVW

El gen del FVW se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 12, específicamente en la posición 12p13,2; se extiende por aproximadamente 175 kb y comprende 52 exones (F 2). La secuencia del gen está parcialmente duplicada por un pseudogen localizado en el cromosoma 22 (Lillicrap, D. 2013). Existen diferentes variantes patogénicas causantes de la EVW; algunas se asocian con distintos tipos de enfermedad y con distintos modelos de herencia. Aproximadamente el 65 % de los casos de índice de EVW tipo 1 presentan variantes patogénicas en el gen, de las cuales aproximadamente el 70 % son missense (Lillicrap, D. 2013; Melo, B. 2006).

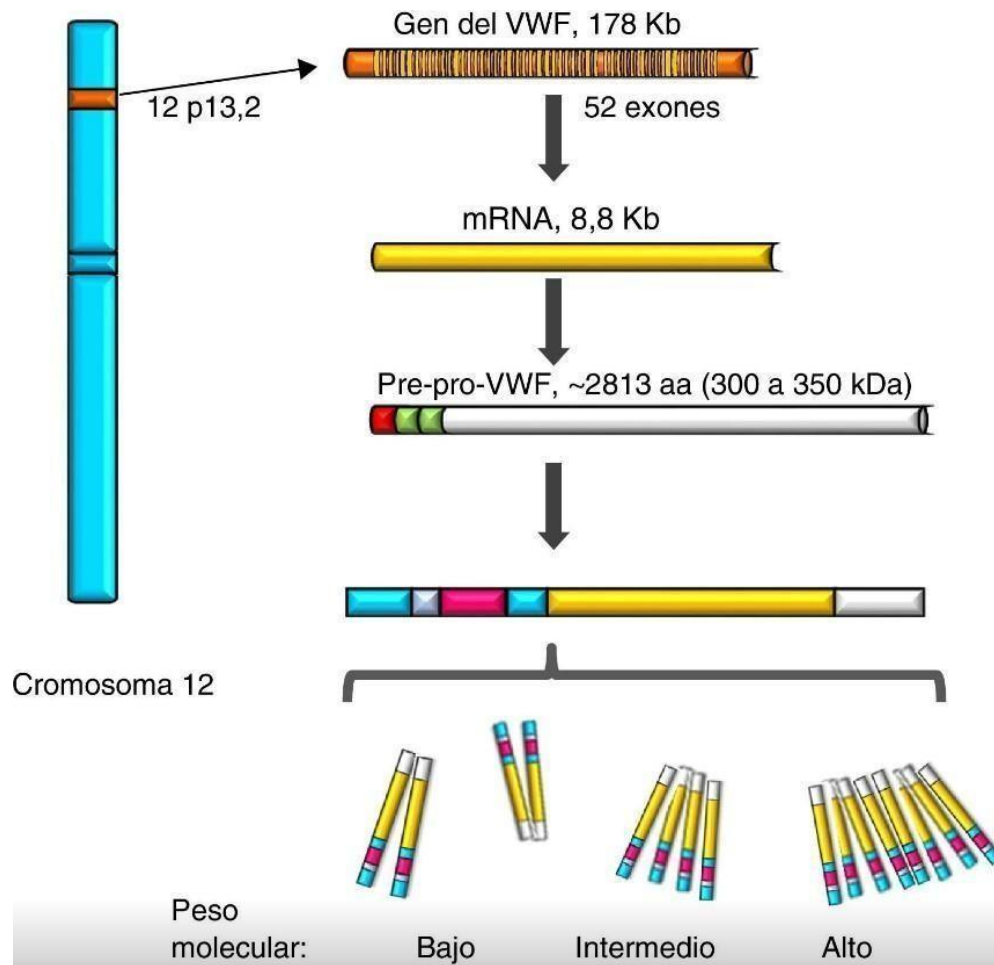


Figura 2. Estructura del gen y la proteína de factor von Willebrand

(Tomado de Hernández *et al.*, 2015)

En la enfermedad tipo 2A, se han reportado principalmente cambios de un solo aminoácido (missense) que afectan las subunidades D1, D2, D3 y A2, así como la subunidad CTCK. Con respecto al tipo 2B, se han reportado variantes missense en el dominio A1 y variantes que potencian la unión a la glucoproteína GPIb α como factores etiológicos en estos casos. En cuanto al tipo 2M, se han observado variantes genéticas en los dominios A1 y A3 que reducen la unión a GPIb α (dominio A1) y/o a colágeno (dominio A3). El tipo 2N se debe a variantes missense en la secuencia que codifica los dominios D' y D3, lo que afecta la unión con el factor VIII. En el tipo 3, se han encontrado variantes patogénicas en el 85 al 90 % de los casos índice, se han descrito delecciones, variantes nonsense, de splicing y missense (Lillicrap, 2013).

Antecedentes sobre estudios genéticos en EVW

En Canadá se realizó un estudio multicéntrico en el que participaron 123 personas con VWD tipo 1 y sus familias. En este estudio se buscó analizar cambios en el gen *VWF* que pudieran estar relacionados con la patogénesis de la enfermedad. Los resultados de este análisis multicéntrico indicaron que, de 123 analizados, 78 fueron vinculados directamente a variantes putativas dentro del gen del factor von Willebrand; el resto de 45 pacientes no presentó cambios que pudieran identificarse (James *et al.*, 2007). De entre los 78 casos identificados como variantes putativas, se identificó una diversidad de 50 tipos: 31 missense, 8 en la región reguladora transcripcional del factor von Willebrand, 5 deleciones o inserciones, 5 variantes de secuencia de empalme y 1 sin sentido.

Del total de casos, en 21 se identificaron más de una variante. Hubo una mayor identificación de posibles variantes en casos más leves, en los que el factor von Willebrand era bajo, pero con contribución de otros factores, como el grupo sanguíneo ABO (en estos casos, la contribución de otros factores es mayor) (James *et al.*, 2007). Como resultado de esta investigación, se concluyó que existe un amplio rango de variantes moleculares asociadas a la enfermedad de von Willebrand. En casos más graves (tipos II y III), se concluyó que los cambios genéticos suelen ocurrir dentro del gen, con alta penetrancia, y en casos leves (tipo I) se caracterizan por cambios genéticos de otra complejidad e implican factores externos al gen *VWF* (James *et al.*, 2007).

En 2007, en el Centro de Investigación de Hemostasia y Trombosis del Hospital Universitario de Amberes, en Bélgica, se realizaron estudios genético-moleculares y pruebas de laboratorio para la enfermedad de von Willebrand recesiva de tipo 2C. Von Willebrand tipo 2C es una de las variantes de la enfermedad la cual se transmite de forma recesiva, esto significa que ambos progenitores deben tener la alteración genética para que el individuo tenga la enfermedad; este tipo de von Willebrand es de gravedad variable, es decir que dependiendo de variantes homocigotas o dobles heterocigotas en los dominios D1 y D2 (partes del gen de factor von Willebrand), la enfermedad puede ser más leve o grave (Michiels *et al.*, 2009).

Según este estudio, después de tratamientos con desmopresina fueron detectadas aún cantidades mínimas de factor von Willebrand, también en sitios ocultos como las plaquetas, lo que permite diferenciar a los pacientes y logra clasificar a los individuos con la enfermedad según tipo I grave, IIC y tipo III recesiva (Michiels *et al.*, 2009). La enfermedad de von Willebrand presenta un patrón multimérico caracterizado por la ausencia de la estructura de triple banda dimérica pronunciada y de multímeros grandes. Se identificó que la EVW de tipo 2C recesiva se debe a homocigosis o doble heterocigosis (dos alelos mutados del mismo gen) de variantes sin sentido en los dominios D1 y D2, que constituyen los dominios del factor von Willebrand (Michiels *et al.*, 2009).

En los estudios en los que se analizó la expresión de FVW mutante recombinante, se registró que el FVW mutante solo forma dímeros (pequeños); es decir, no tiene la capacidad de formar multímeros de peso molecular medio ni alto, lo cual es característico de la enfermedad de von Willebrand tipo 2C. También reconocieron que individuos que portan la variante heterocigota sin sentido, en la región de los dominios D1 y D2 del gen del factor, son individuos que posiblemente tengan una expresión leve de la enfermedad de von Willebrand de tipo I, y presentan un patrón multimérico con gran presencia de dímeros de factor von Willebrand (Michiels *et al.*, 2009). Esto lleva a demostrar que EVW de tipo 2C mutante es capaz de formar dímeros y no multímeros (esenciales para la coagulación), pero también es posible que, al no ser homocigotas, presenten un fenotipo leve de la enfermedad.

Uno de los más recientes estudios de cohorte realizados en Alemania tuvo como objetivo principal investigar variantes genéticas y características fenotípicas de la enfermedad de von Willebrand, para identificar sus bases genéticas y asociar el fenotipo con el genotipo (Krahforst *et al.*, 2024). En este estudio de cohorte participaron 221 pacientes con indicador cuantitativo de factor de von Willebrand y 47 individuos con niveles plasmáticos normales de factor de von Willebrand, esto es, dentro de 50/70 UI/dL. Los métodos utilizados para el análisis fueron la secuenciación del gen del factor de von Willebrand, el estudio de la variación en el número de copias y el análisis bioinformático (Krahforst *et al.*, 2024). Según la clasificación de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia, los resultados se clasifican en: 77 pacientes como portadores de VWD tipo 1 < 30 UI/dL, 111

como portadores de VWD tipo 1 con valores entre 30 y 50 UI/dL y 33 individuos portadores de VWD tipo 3 (Krahforst *et al.*, 2024).

Según los grupos clasificados en orden, las tasas de variantes encontradas en cada uno fueron de 88%, 65% y 92%. Al analizar el grupo sanguíneo ABO, se observó una sobrerrepresentación del grupo O en los individuos clasificados como tipo 1 de 30 a 50, principalmente en los individuos negativos a la variante. Esto indica que el grupo sanguíneo O podría ser una causa. También se identificaron 223 variantes del factor de von Willebrand, de las cuales 147 fueron consideradas como variantes distintas en individuos con von Willebrand cuantitativo; de estas, 57 fueron registradas como nuevas (Krahforst *et al.*, 2024). Cerca del 70% de los individuos clasificados dentro de los límites de 50 a 70 UI/dL indicaron tener variantes del factor de la enfermedad de von Willebrand. En conclusión, se encontraron patrones de variantes distintos entre los subgrupos, principalmente una gran disparidad en las variantes entre von Willebrand tipo I < 30 UI/dl y von Willebrand tipo I 30-50 UI/dl (Krahforst *et al.*, 2024).

En una investigación realizada en México se incluyeron 802 pacientes, entre ellos hombres y mujeres de diversas edades; todos presentaban cierta sintomatología que podía indicar un padecimiento de von Willebrand. Los pacientes pasaron por una serie de análisis, entre ellos la biometría hemática, la concentración de fibrinógeno, el antígeno de factor von Willebrand, la activación de factor VIII y el análisis de multímeros del factor von Willebrand. Mediante las pruebas realizadas, de los 802 pacientes, 639 fueron diagnosticados con enfermedad de von Willebrand, de los cuales 582 fueron clasificados con von Willebrand de tipo I, 52 pacientes con von Willebrand tipo II y la clasificación con menor cantidad de pacientes fue en von Willebrand de tipo III, con 5 pacientes identificados (Hernández J, 2024).

Se calculó el promedio de edad de los pacientes confirmados con la enfermedad, identificándose en mujeres y en hombres con una edad promedio de 22 años. En 40 casos, el diagnóstico de la enfermedad fue inconcluso y en 123 casos se descartó que los pacientes fueran portadores. Se identificó en los pacientes en los que se confirmó la enfermedad el grupo sanguíneo O como denominador común (Hernández J, 2024). Mediante esta investigación, se logró cuantificar que la enfermedad de von Willebrand es tan común en México como en otros países (Hernández J, 2024).

Un grupo de investigadores del Instituto de Investigaciones Hematológicas “Mariano R Castex”, Buenos Aires Argentina, redactaron un artículo basado en describir la diagnóstica y terapéutica de pacientes con enfermedad de von Willebrand, entre lo investigado, resaltan cuán importante es caracterizar el trastorno de forma integral, mediante pruebas fenotípicas y genotípicas, para clasificar los tipos de severidad dentro de la enfermedad; pero también señalan la importancia de análisis moleculares ya que estos realizan diferenciaciones más profundas como por ejemplo diferenciar von Willebrand tipo 2N de hemofilia leve (Woods *et al.*, 2011). En esta investigación, los autores demuestran la necesidad de continuar priorizando estudiar la correlación genético-fenotípica, para un mejor diagnóstico y tratamiento (Woods *et al.*, 2011).

JUSTIFICACIÓN

Según datos de la Federación Mundial de Hemofilia (WFH), en su reporte más reciente publicado en 2025, reportan que en 2024 la cifra de personas identificadas con la enfermedad de von Willebrand (EVW), es de 115,672 personas en el mundo; en Uruguay se han reportado 263 pacientes con la enfermedad, aunque en la práctica estos datos pueden ser mayores, por un posible subregistro; por otra parte, estimaciones de la WFH indican la tendencia al incremento de casos por año (World Federation of Hemophilia, 2025). Es de gran importancia contribuir a que se continúe construyendo el conocimiento en todas las áreas, principalmente en el área de la salud; cuanto más analizada y descrita está una enfermedad, mayores son las posibilidades de diagnóstico y de un mejor tratamiento.

La enfermedad de von Willebrand presenta síntomas que pueden asemejarse a otros trastornos de la coagulación, lo que conduce a diagnósticos erróneos, tratamientos inadecuados y una baja calidad de vida, con consecuencias graves. En resumen, cuanto más se conozca sobre la enfermedad, disminuye la cantidad de personas portadoras y no diagnosticadas, teniendo en consideración que en Uruguay aún no existen reportes sistemáticos sobre las causas genéticas de la enfermedad de von Willebrand.

OBJETIVOS

Objetivo General

Describir las variantes genéticas (patogénicas y benignas) presentes en pacientes con enfermedad de von Willebrand en Rivera, Uruguay.

Objetivos Específicos

- Detectar variantes patogénicas en el gen del factor de von Willebrand.
- Detectar y describir variantes benignas en regiones codificantes y no codificantes del gen del factor de von Willebrand.
- Analizar los efectos de las variantes (patogénicas y benignas) detectadas en el gen del factor von Willebrand y desde el punto de vista poblacional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra

Se estudiaron 6 pacientes con diagnóstico de EVW, atendidos en el Hospital Departamental de Rivera. Las muestras de ADN de dichos pacientes se encuentran almacenadas en el PDU de Diversidad Genética Humana; fueron extraídas previamente de sangre periférica.

Aspectos bioéticos

La obtención de la información bioquímica, fenotípica y genealógica de los pacientes se realizó con consentimiento informado, aprobado por el Comité de Ética de la Investigación Científica de la Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación, con número de expediente 121900000602-19 (anexos 1 y 2). El procedimiento de muestreo se realizó bajo la autorización y supervisión del médico tratante y la obtención de las muestras de sangre fue realizada por el personal de hemoterapia del Hospital Departamental de Rivera.

Se garantiza la confidencialidad de los datos asignando una numeración a las muestras de las familias; asimismo, los individuos fueron debidamente informados de que sus datos serían

resguardados de manera segura en el PDU de Diversidad Genética Humana del Centro Universitario de Tacuarembó, UdelaR, y solo se utilizarán con fines de investigación. En el caso de los menores que participaron en el estudio, el consentimiento informado fue otorgado por sus padres o tutores legales, quienes son los responsables de autorizar su participación en la investigación. Todo este procedimiento también se realizó con autorización médica.

Análisis molecular

Para el análisis molecular se empleó un panel de secuenciación masiva paralela, que fue puesto a punto previamente en trabajos del PDU de Diversidad Genética Humana y de la Plataforma Genómica de la Facultad de Ciencias, Udelar. Los primers utilizados fueron diseñados desde la plataforma Illumina® DesignStudio en dos pooles. Dicho panel permitió estudiar los 52 exones, las uniones intrón-exón, así como los extremos 5' y 3' del gen *VWF*. El protocolo de análisis de dicho panel se describe a continuación:

1- Preparación de las librerías genómicas

Las librerías genómicas se preparan con el kit *AmpliSeq for Custom and Community Panels* de Illumina®. Siguiendo el siguiente protocolo:

1.1 Amplificación de los targets. Por muestra:

Preparación de Mix 1

- HiFi Mix 5X: 5 uL
- ADN (28 ng): 7 uL
- Mezclar con vórtex y realizar un centrifugado suave.

Volumen final: 12 uL

Preparación de Mix 2

- Transferir 5 uL de Mix 1 a dos tubos, rotulados como: Pool 1 y Pool 2.
- Al tubo Pool 1 le agrego 5 uL de primers AmpliSeq panel Pool 1 (2X).
- Al tubo Pool 2 le agrego 5 uL de primers AmpliSeq panel Pool 2 (2X).

- Mezclar con vórtex y realizar un centrifugado suave.

Volumen final por Pool: 10 uL

Termociclado

99 °C por 2 minutos

99 °C por 15 segundos

60 °C por 4 minutos

10 °C hasta 24 horas.

1.2 Digestión parcial de los amplicones. Por muestra: -

Unir Pool 1 y Pool 2 (volumen final 20 uL)

- Agregar 2 uL de enzima FuPa Illumina®.
- Mezclar con vórtex y realizar un centrifugado suave.

Volumen final: 22 uL.

- Incubación en termociclador:

50 °C por 10 minutos

55 °C por 10 minutos

62 °C por 20 minutos

10 °C hasta 1 hora.

1.3 Ligación de los índices. Por muestra:

- 22 µL de reacción parcialmente digerida
- Solución Switch: 4 uL
- UD índices de AmpliSeq Illumina®: 2 µL
- Enzima Ligasa de ADN: 2 uL
- Mezclar con vórtex y realizar un centrifugado suave.

Volumen final: 30 μ L.

- Incubación en termociclador:

22 °C por 30 minutos

68 °C por 5 minutos

72 °C por 5 minutos

10 °C hasta 24 horas.

1.4 Purificación de la librería. Por muestra:

- Agregar 30 μ L de perlas magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter, EE. UU.)
- Mezclar suavemente con vórtex hasta homogeneizar y centrifugar.
- Incubar a T.A. durante 5 minutos.
- Colocar en el rack magnético hasta que claree (aproximadamente 2 minutos).
- Remover y descartar el sobrenadante.
- Manteniendo los tubos en el rack magnético, realizar dos lavados como sigue a continuación:
- Agregar 150 μ L de etanol absoluto fresco al 70 %.
- Incubar a T.A por 30 segundos
- Descartar el sobrenadante sin resuspender las perlas magnéticas
- Realizar una centrifugación breve.
- Colocar nuevamente en el rack magnético y eliminar los restos de sobrenadante.
- Dejar secar las perlas magnéticas durante aproximadamente 10 minutos.

1.5 Amplificación de las librerías. Por muestra:

- Al tubo con las perlas magnéticas purificadas agregó 45 μ L de Mix Lib Amp (1X)
- 5 μ L de primers de amplificación de las librerías.

Volumen final: 50 μ L.

- Termociclado:

98 °C por 2 minutos

98 °C por 15 segundos

64 °C por 1 minuto

10 °C hasta 24 horas.

1.6 Segunda purificación

La segunda purificación se realizó en dos etapas. **En la primera**, los fragmentos de ADN de alto peso molecular son capturados por las perlas magnéticas y luego se descartan, por lo que la librería y los restos de primers quedan en el sobrenadante. **En la segunda parte**, las perlas magnéticas retienen la librería, mientras que los restos de primers se descartan en el sobrenadante. El protocolo se explica a continuación:

1.6.1- Primera etapa:

- Agregar 25 µL de perlas magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter, EE. UU.) a los 50 µL de la librería.
- Mezclar suavemente con vórtex hasta homogeneizar y centrifugar.
- Incubar a T.A. durante 5 minutos.
- Colocar en el rack magnético hasta que claree (aproximadamente 5 minutos).
- Transferir el sobrenadante (75 µL) a un nuevo tubo.

1.6.2 Segunda etapa:

- Agregar 60 µL de perlas magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter, EE. UU.) a los 75 µL de sobrenadante recuperados en la primera etapa.
- Mezclar suavemente con vórtex hasta homogeneizar y centrifugar.
- Incubar a T.A. durante 5 minutos.
- Colocar en el rack magnético hasta que claree (aproximadamente 5 minutos).
- Remover y descartar el sobrenadante.
- Manteniendo los tubos en el rack magnético, realizar dos lavados como sigue a continuación:
- Agregar 150 µL de etanol absoluto fresco al 70 %.

- Incubar a T.A por 30 segundos
- Descartar el sobrenadante sin resuspender las perlas magnéticas
- Realizar una centrifugación breve.
- Colocar nuevamente en el rack magnético y eliminar los restos de sobrenadante.
- Dejar secar las perlas magnéticas durante aproximadamente 5 minutos.
- Retirar del rack magnético y agregar 30 μ L de low T.E.
- Transferir el sobrenadante (27 μ L) a un nuevo tubo. Este sobrenadante contiene las librerías de los amplicones del panel de genes.

2- Chequeo de la calidad de las librerías

2.1 Cuantificación

Se realizó la cuantificación utilizando el fluorómetro Qubit (Thermo Fisher™) con el kit de reacción Qubit HS. Bajo el siguiente protocolo:

3- Secuenciación

Posteriormente, las bibliotecas combinadas se secuenciaron utilizando el sistema Illumina® Miniseq con cartucho de reactivo de salida media (2X150 ciclos, lecturas de extremos emparejados).

4- Análisis bioinformático

Se utilizó el software Geneious Prime® para analizar los archivos FASTQ siguiendo el siguiente flujo de trabajo. Primero, se aplicó el programa Dedupe (Duplicate Read Remover, versión 38.84) de BBtools a las secuencias de extremos emparejados para eliminar lecturas duplicadas. Luego, se utilizó BBDuk (Adapter/Quality Trimming versión 38.84) de BBtools para recortar los adaptadores de Illumina (pool 1 y pool 2), seguido de mapear los contigs con Geneious Mapper contra las secuencias de referencia: NG_009072 (VWF). Para detectar las variantes codificantes y no codificantes, se empleó el buscador de variantes/SNP de Geneious Prime® para identificar variantes benignas, posiblemente patogénicas y estructurales, y analizar los efectos de las variaciones en la traducción de proteínas. Además, se calcularon los valores p de las variaciones y se filtraron las variaciones con un valor p máximo de 10^{-6} . La profundidad de cobertura

mínima establecida fue de 100X con un puntaje de calidad de bases > 30. Finalmente, las variantes patogénicas encontradas fueron revisadas en bases de datos como LOVD v.3.0 (Leiden Open Variation Database), EAHAD, CHAMP, HGMD y ClinVar. Para revisar la patogenicidad de las variantes, se utilizaron los programas Varsome y MutationTaster.

RESULTADOS

Se encontraron 3 variantes patogénicas que afectan los dominios D' y D3 y el dominio A2, dominios funcionales de la proteína FVW, y que pueden contribuir a explicar el fenotipo de los pacientes. Por otra parte, en 3 pacientes, no se detectaron variantes patogénicas. También se identificaron variantes polimórficas ya reportadas en otras investigaciones: 26 en regiones codificantes y 38 en regiones no codificantes. (Figura 3). Las variantes identificadas se han reportado en poblaciones de origen europeo, afroamericano, asiático y caucásico; las mismas se detallan a continuación:

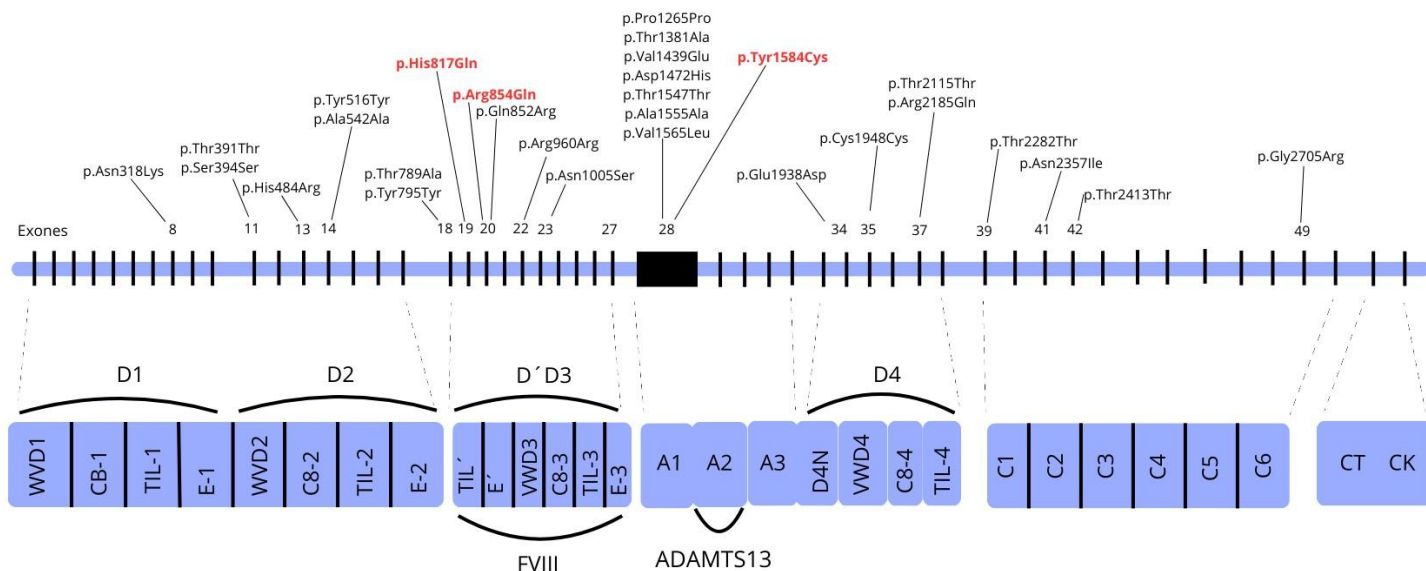


Figura 3. Esquema de variantes patogénicas y benignas en regiones codificantes

Leyenda: variantes polimórficas. **Variantes patogénicas.**

Variantes patogénicas

En la muestra del paciente 42EVW se detectó una variante patogénica, localizada en el exón 28, en la posición c.4751A>G; produce por un cambio de aminoácido, de una tirosina a una cisteína, en la posición 1584. Luego, en el paciente 61EVW, específicamente en el exón 20, se encontró una alteración en la posición c.2561 G>A, en la que el aminoácido arginina cambió por glutamina en la posición 854. La tercera alteración patogénica fue encontrada en el paciente 28EVW: una alteración en la posición c.2451T>C, donde se sustituye la histidina por glutamina en la posición 817; este cambio ocurre en el exón 19 del gen (T1). Todas estas variantes ya están reportadas en las bases de datos como causantes de EVW.

Tabla 1. Variantes patogénicas detectadas en pacientes con EVW del noreste de Uruguay

Paciente	c.DNA	Cambio aminoácido	Tipo de variante	Cambio proteína	Exón	Dominio	Cigosidad
42EVW	c.4751 A > G	p.Tyr1584Cys	Transición	Missense	28	D'D3	Het
61EVW	c.2561 G > A	p.Arg854Gln	Transición	Missense	20	A2	Het
28 EVW	c.2451 T > A	p.His817Gln	Transversión	Missense	19	A2	Het

Leyenda: Het: heterocigoto

Variantes polimórficas en regiones codificantes

También se identificaron 26 variantes polimórficas en regiones codificantes del gen VWF, variantes que producen cambios de aminoácido y variantes sinónimas, consideradas benignas. En el exón 8 se encontró la variante p.Asn318Lys (c.954T>A) en 6 pacientes. En el exón 11 se encontraron las variantes

p.Thr391Thr (c.1173A>T) y p.Ser394Ser (c.1182A>C), ambas en un mismo paciente. En el exón 13 se identificó la variante p.His484Arg (c.1451A>G) encontrada en cinco de seis pacientes.

Luego, en el exón 14 se registraron dos variantes: p.Tyr516Tyr (c.1548T>C), p.Ala542Ala (c.1626G>A). La variante p.Tyr516Tyr se encontró en cinco de los seis individuos, y la variante p.Ala542Ala solo en un individuo (T2). En el exón 18 se identificó la variante p.Thr789Ala (c.2365A>G) en cinco de los individuos analizados, así como la variante p.Tyr795Tyr (c.2385T>C), identificada en todas las muestras.

En el exón 20, la variante p.Glu852Arg (c.2555A>G) se encontró en todos los individuos (Tabla 2). En el exón 22 se detectó una variante en p.Arg960Arg (c.2880G>A) y, en el exón 23, la variante p.Asn1005Ser (c.3014A>G). En el exón 28, el más grande del gen, se identificaron siete variantes: p.Pro1265Pro (c.3795G>A), p.Thr1381Ala (c.4141A>G), encontrada en cinco de seis pacientes; la variante p.Val1439Glu (c.4316T>A); p.Asp1472His (c.4414G>C); p.Thr1547Thr (c.4641T>C); p.Val1555Ala (c.4665A>C); y la variante p.Val1565Leu (c.4693G>T). En el exón 35, fue encontrada la variante p.Cys1948Cys (c.5844 C>T) en tres de seis de los pacientes, también, en el exón 37, se identificaron las variables p.Thr2115Thr (c.6345 T>A) y p.Arg2185Gln (c.6554 G>A), ambas en un mismo paciente.(T2)

En el exón 39 se identificó p.Thr2282Thr (c.6846A>G) en dos pacientes (T2). Se encontró una variante en el exón 41 p.Asn2357Ile (c.7070A>T). En el exón 42 se identificó el cambio p.Thr2413Thr (c.7239 T>C). Como último hallazgo, en el exón 49 se encontró la variante p.Gly2705Arg (c.8113 G>A) en un solo paciente. (T2).

Tabla 2. Variantes polimórficas de regiones codificantes

Cambio de aminoácido	c.DNA	Exón	28 EVW	34 EVW	42 EVW	61 EVW	81 EVW	140 EVW
p.Asn318Lys	c.954 T-A	8	Hh				Hh	
p.Thr391Thr	c.1173A-T	11					Hh	
p.Ser394Ser	c.1182A-C	11					Hh	
p.His484Arg	c.1451 A-G	13		HH	HH	HH	Hh	Hh
p.Tyr516Tyr	c.1548 T-C	14	Hh	Hh	Hh	Hh	HH	
p.Ala542Ala	c.1626 G-A	14		Hh				
p.Thr789Ala	c.2365 A-G	18		Hh	Hh	Hh	HH	Hh
p.Tyr795Tyr	c.2385 T-C	18	Hh	Hh	Hh	Hh	HH	Hh
p.Gln852Arg	c.2555A-G	20	Hh	HH	HH	HH	HH	HH
p.Arg960Arg	c.2880 G-A	22		Hh	Hh	Hh	Hh	
p.Asn1005Ser	c.3014 A-G	23	Hh		Hh			Hh
p.Pro1265Pro	c.3795 G-A	28	Hh					
p.Thr1381Ala	c.4141 A-G	28		Hh	Hh	Hh	Hh	Hh
p.Val1439Glu	c.4316 T-A	28						Hh
p.Asp1472His	c.4414 G-C	28	Hh					
p.Thr1547Thr	c.4641 T-C	28						Hh
p.Ala1555Ala	c.4665 A-C	28		Hh		Hh		
p.Val1565Leu	c.4693 G-T	28		Hh				
p.Glu1938Asp	c.5814 G-C	34	Hh		Hh	Hh	Hh	
p.Cys1948Cys	c.5844 C-T	35	Hh	HH				HH
p.Thr2115Thr	c.6345 T-A	37	Hh					
p.Arg2185Gln	c.6554 G-A	37	Hh					
p.Thr2282Thr	c.6846 A-G	39			Hh	Hh		
p.Asn2357Ile	c.7070A-T	41					Hh	
p.Thr2413Thr	c.7239 T-C	42		HH	Hh	HH	Hh	HH
p.Gly2705Arg	c.8113 G-A	49		Hh				

Leyenda: HH: Homocigota, Hh: Heterocigota.

Variantes polimórficas en intrones

En los intrones también se encontraron 38 cambios nucleotídicos; todos ellos se muestran según su número de referencia (rs) y han sido reportados como benignos.

En el intrón 1 se identificó la variante rs2286608 (c.1511 C-T); en el intrón 4, la variante rs6489694 (c.3649 T-C); y en el intrón 6, se encontraron dos variantes: rs7980045 (c.29322 AC) y c.75668 A-C, sin rs identificado reportado. En el intrón 12 se reportaron también dos variantes rs2239158, (c.61544 A-G) y rs2239159 (c.61589 G-T); en el intrón 15 fueron identificadas tres variantes rs73034900 (c.71762 A-G), rs10622633 (c.71973_71974insTCT) y c.149731_149733+TCT sin rs reportado. En el intrón 17 se identificó la alteración rs36105228 (c.80198_80199delinsGT-AC) y, en el intrón 19, c.55440 G-C, sin reportar rs. En el intrón 22 se encontraron varias variantes c.55440 G-C, c.69547 T-C, c.80559 G-A, c.8651 T-C, rs11063999 (c.95527 A-G), c.98615 T-C, rs34877178 (c.98672 G-A) y la variante c.98683 T-C. En el intrón 23 solamente la variante rs56121649 (c.98988 G-C).

Dos variantes fueron encontradas en el intrón 24 rs114018824 (c.99312 G-C) y rs73051263 (c.99222 C-T). Desde el intrón 28 hasta el intrón 35 se reportó una variante por intrón: en el intrón 28, la variante rs17491418 (c.106536 A-C); en el intrón 30, rs57349683 (c.108492 G-C); en el intrón 33, c.89643 G-A; en el intrón 34, rs216903 (c.128438 A-G); y en el intrón 35, la variante rs17491334 (c.130093 C-T). En el intrón 38 se identificaron dos variantes: rs116410139 (c.138948 A-G) y rs177702 (c.139092 C-T). Dos variantes también en el intrón 40: C-T, rs55867239 (c.141495 C-T), y en el intrón 41: rs144618038 (c.141790 C-T) y rs216868 (c.142773 C-T). Las últimas variantes encontradas son únicas por intrón, desde el intrón 42, al 51; en el intrón 42, rs216855 (c.148424 T-C), en el intrón 43 c.148755 (T)10(T)11, intrón 44 rs2270239 (c.155321 A-C), en el intrón 47 c.123373 C-T, intrón 49 rs2270152 (A-C) y por último en el intrón 51, la variante rs2362483 (c.175017 T-C) (T4).

Tabla 3. Variantes polimórficas en regiones intrónicas (frecuentes)

ID	Posición genómica	Intrón	28 EVW	34 EVW	42 EVW	61 EVW	81 EVW	140 EVW
rs2286608	g.1511 C-T	1	HH			Hh	HH	Hh
rs6489694	g.3649 T-C	4	HH	HH				HH
rs7980045	g.29322 A-C	6					Hh	
rs2239158	g.61544 A-G	12		HH	HH	HH		
rs2239159	g.61589 G-T	12					HH	HH
rs36105228	g.80198_ 80199 delinsGT-AC	17			Hh	Hh		Hh
rs11063999	g.95527 A-G	22		Hh	Hh	Hh	Hh	
rs34877178	g.98672 G-A	22			HH	Hh		
rs56121649	g.98988 G-C	23			Hh	Hh	Hh	
rs216903	g.128438 A-G	34	HH			Hh		
rs17491334	g.130093 C-T	35			Hh	Hh		
rs177702	g.139092 C-T	38		HH	HH	HH	Hh	Hh
rs55867239	g.141495C-T	40			Hh			
rs216868	g.142773 C-T	41	Hh	HH				Hh
rs216855	g.148424 T-C	42	HH	HH	Hh	Hh	Hh	
-----	g.148755 (T)10-(T)11	43						
rs2270239	g.155321 A-C	44	Hh	Hh	HH		Hh	HH

Leyenda: HH: Homocigota, Hh: Heterocigota

Tabla 4. Variantes polimórficas en regiones intrónicas (únicas*)

ID	Posición genómica	Intrón	28 EVW	34 EVW	42 EVW	61 EVW	81 EVW	140 EVW
rs7980045	g.29322 A-C	6					Hh	
-----	g.75668 A-C	6				Hh		
rs73034900	g.71762 A-G	15				Hh		
rs10622633	g.71973_71974insTCT	15			HH			
-----	g.149731_149733+TCT	15						Hh
-----	g.55440 G-C	19						Hh
-----	g.69547 T-C	22	Hh					
-----	g.80559 G-A	22		Hh				
-----	g.8651 T-C	22			Hh			
-----	g.98615 T-C	22			Hh			
-----	g.98683 T- C	22			Hh			
rs114018824	g.99312 G-C	24	Hh					
rs73051263	g.99222 C-T	24				Hh		
rs17491418	g.106536 A-C	28					Hh	
rs57349683	g.108492 G-C	30	Hh					
-----	g.89643 G-A	33			Hh			
rs116410139	g.138948 A-G	38	Hh					
rs55867239	g.141495C-T	40			Hh	Hh		
rs144618038	g.141790 C-T	41			Hh			
-----	g.123373 C-T	47		HH				
rs2270152	g.172868 A-C	49		Hh				
rs2362483	g.175017 T-C	51		Hh				

Leyenda: HH: Homocigota, Hh: Heterocigota. *Alelo encontrado sólo en un paciente del grupo estudiado

DISCUSIÓN

En este trabajo se analizaron regiones codificantes, uniones intrón-exón, la región promotora 5' y la región 3' del gen VWF de seis pacientes del noreste de Uruguay, específicamente de la ciudad de Rivera, con el objetivo de identificar variantes genéticas que puedan explicar el fenotipo observado en pacientes diagnosticados con la enfermedad de von Willebrand. El análisis permitió localizar múltiples variantes del gen VWF, algunas ya reportadas; su identificación en diferentes poblaciones nos brinda evidencia para comprender su patogenicidad y para caracterizar las distintas expresiones y severidades de la enfermedad.

Los resultados nos aportan información sobre la variabilidad genética del gen VWF en los pacientes analizados, lo que permite relacionar los datos moleculares, bioquímicos y clínicos de estudios previos.

Variantes Patogénicas:

Se identificó una variante patogénica en el paciente 42EVW (T1). La variante se localiza en el exón 28 del gen VWF, específicamente en la posición c.4751A>G. En la proteína ocurre un cambio de aminoácido: la tirosina por cisteína en el codón 1584. Se observa que el paciente posee una copia de la variante, ya que se encuentra en estado heterocigoto. Se ha descrito esta variante con alta frecuencia en Suecia y Canadá, es una variante patogénica que afecta al dominio funcional A2 del FWV, el cual es responsable de la regulación del clivaje de la proteína por medio de la proteasa ADAMTS13, esta variante favorece el clivaje de VWF lo cual produce una reducción de los multímeros de alto peso molecular, como consecuencia disminuye la actividad hemostática del factor von Willebrand en sangre (Woods *et al.*, 2019). En investigaciones anteriores se observó que p.Tyr1584Cys se asocia de forma secundaria a una reducción del factor VIII (Christopherson *et al.*, 2023; Woods *et al.*, 2019). Diferentes investigaciones han reportado esta variante como una de las más frecuentes asociadas a la enfermedad de von Willebrand de tipo 1, con una presencia marcada en la población europea (Cumming *et al.*, 2006).

Entre las variantes también fue identificada otra alteración patogénica en la muestra 61EVW: la posición c.2561 G>A. El paciente es heterocigoto para la alteración; el cambio de aminoácido es p.Arg854Gln, uno de los cambios de aminoácido más frecuentes asociados a VWF. Esta alteración está ubicada en el exón 20 del gen, que codifica al dominio D'D3 del gen, principal mediador en la unión al FVIII (Peerlinck *et al.*, 1992). Se ha descrito que esta es una de las variantes más comunes que caracteriza la enfermedad de von Willebrand de tipo 2, la variante ha sido reportada por asociarse en comprometer el funcionamiento normal del complejo VWF y FVIII; en estudios previos donde se encontró esta alteración, el paciente poseía niveles de factor VIII sumamente bajo, debido a esto se vio comprometida la unión factor VIII, con el factor von Willebrand, provocando inestabilidad en la hemostasia, resultando en expresiones clínicas de la enfermedad (Peerlinck *et al.*, 1992). En reportes actuales de la base de datos gnomAD (gnomad.broadinstitute.org/), encontramos que el cambio de arginina por glutamina en la posición 854 (también conocida como rs41276738) se encuentra en baja frecuencia en la población general, pero en algunas poblaciones el alelo es más común: en población afroamericana, 0.0914%, y en población europea, 0.606% (Variant 12-6026000 T > C).

En el paciente 28EVW se identificó un cambio missense en la posición c.2451T>C, donde se produce la sustitución de histidina por glutamina en el codón 817. La variante se localiza en el exón 19, comprendido por el dominio D'D3, región involucrada en la unión del factor von Willebrand con el factor VIII. En investigaciones previas se ha reportado que alteraciones en este dominio están asociadas a disminución del factor VIII a nivel plasmático (Johnsen *et al.*, 2013; Bellissimo *et al.*, 2012). Según un estudio realizado en base a secuenciación de exomas, en el cual se logró identificar variantes raras del gen VWF y otros genes referentes a funciones hemostáticas, se logró complementar información brindada por GWAS, donde se encontró asociación de esta variante p.His817Gln, relacionada a niveles de factor VIII alrededor de $9e15$ lo que indica que el factor VIII es muy bajo en plasma; esto revela una asociación robusta entre la variante del gen y el bajo nivel plasmático de factor VIII (Pankratz N *et al.*, 2022). Según estudios que informan sobre la frecuencia alélica, se observa que la variante está presente en un 11,5 % en la población afroamericana, aunque también está presente en menor porcentaje en otras poblaciones (Johnsen *et al.*, 2013).

En tres de los pacientes analizados no se detectaron variantes patogénicas. Existen estudios que confirman que cerca de un 35% de los pacientes con enfermedad von Willebrand tipo I no presentan variantes patogénicas conocidas en el gen von Willebrand lo cual podría explicarse por la existencia de otros genes que participan en la hemostasia, los cuales pueden contribuir en fenotipos observados en la clínica del paciente. También es posible que intervengan factores de regulación como mecanismos epigenéticos que pueden interferir en la expresión de la enfermedad sin demostrar cambios en la secuencia codificante del gen VWF (Sadler B *et al.*, 2021).

Variantes Polimórficas:

También se identificaron cambios de aminoácidos no patogénicos en los seis pacientes analizados. Las variantes se encuentran a lo largo de diversos exones del gen VWF; las primeras alteraciones encontradas se localizaron en el exón 8 y las últimas en el exón 49.

Estas variantes se encuentran en exones del gen VWF; en su mayoría son cambios sinónimos, en los que sólo un nucleótido se modifica y el aminoácido continúa siendo el mismo, o bien algunas variantes sí modifican el aminoácido, pero se clasifican como benignas. Por ello, estas variantes se reportan como polimorfismos en las bases de datos.

En los individuos analizados se han encontrado múltiples variantes homocigotas y heterocigotas correspondientes a polimorfismos de la población; en una gran mayoría se observan en estado heterocigoto (heterocigota = Hh, ver tabla 2). Las regiones más comunes en las que se localizaron las variantes son los exones 11, 14, 18, 20 y 28, que se repitieron entre los seis pacientes. En una de las primeras regiones, el exón 8, se identificó la variante p.Asn318Lys (c.954T>A), presente en dos individuos de los estudiados, ambos en estado heterocigota (Hh). Según reportes de la base de datos varsome, este es un cambio bastante frecuente en la población general, pero mayormente en la población afroamericana, donde se observa en un 44,70 %, en la población de Medio Oriente en un 9,19 % y en la población surasiática en un 7,89 % (Kopanos Ch, 2019). Este exón pertenece al dominio D1, que participa en el plegamiento y la dimerización. En varios reportes, la variante se describe como un

polimorfismo de alta frecuencia, sin implicaciones en el efecto funcional del factor von Willebrand ni en ningún factor asociado (Bellissimo *et al*, 2012; Kopanos Ch, 2019).

En el exón 11 encontramos las variantes p.Thr391Thr (c.1173A>T) y p.Ser394Ser (c.1182A-C) en estado heterocigoto (HH). En este caso, vemos que ambos cambios son sinónimos: en la posición 391 se sustituye una treonina por otra, y en la posición 394 se sustituye una serina por otra serina, lo que se denomina polimorfismo neutro. En el exón 13 se encuentra la variante p.His484Arg (c.1451A>G), uno de los polimorfismos más frecuentes, detectada en cinco de las seis muestras, tanto en estado homocigota como heterocigota. Luego, en el exón 14, registramos dos variantes: p.Tyr516Tyr (c.1548T>C), p.Ala542Ala (c.1626G>A). La variante p.Tyr516Tyr se encuentra en cinco de los seis individuos; todos en estado heterocigoto. La variante p.Tyr516Tyr ha sido reportada como polimorfismo común en poblaciones afroamericana y de África oriental, donde se encuentra con mayor frecuencia (Woods *et al*, 2019).

Por otra parte, dentro del mismo exón p.Ala542Ala se encontró solo en una muestra, también heterocigota y ya antes reportada como benigna, pero con baja frecuencia poblacional. Los exones 11, 13 y 14 forman parte del dominio D2; dominio que participa en la formación de dímero y en el transporte del factor de forma intracelular, todas las variantes reportadas en esta región han sido clasificadas en la base como benignas o probablemente benignas, ninguna de estas variantes ha sido asociada a efectos negativos de transporte o formación del factor (Kopanos Ch, 2019; Bellissimo *et al*, 2012).

Luego, en el exón 18, se identificaron dos variantes: p.Thr789Ala (c.2365A>G) y p.Tyr795Tyr (c.2385T>C), ambas reportadas como polimorfismos frecuentes del gen VWF, según reportes; en cuanto a la cigosis, se encuentran más homocigotas, pero también algunas heterocigotas. La variante p.Thr789Ala se encuentra principalmente en poblaciones chinas y suecas, pero también en poblaciones caucásicas y afroamericanas (Woods *et al*, 2019; Williams *et al*, 2017). También la variante p.Tyr795Tyr presenta alta frecuencia en la población china y en Japón, y en menor porcentaje en Europa (Woods *et al*, 2019). Las variantes del exón 18 han sido objeto de varios análisis debido a que suelen reportarse juntas. Ambas variantes son consideradas benignas en plataformas como ClinVar, pero en estudios recientes su benignidad

se ha puesto en discusión ya que se reportaron estudios donde demuestran que cuando las variantes actúan en conjunto podrían actuar de forma combinada en los individuos que son portadores, así llevando a expresar la enfermedad de von Willebrand, pero actualmente esa condición no es estadísticamente significativa (Shahbazi et al., 2012).

En el exón 20 se observa la variante p.Gln852Arg (c.2555A>G), presente en todos los individuos: cinco homocigotas y una heterocigota. Según estudios, es una variante de alta frecuencia, bastante común, reportada únicamente en población americana (Woods et al., 2019). En el exón 22 se detectó una variante en p.Arg960Arg (c.2880G>A), un polimorfismo de origen europeo, también presente en un bajo porcentaje de nigerianos (Woods et al., 2019). En el exón 23, la variable p.Asn1005Ser (c.3014A>G), encontrada en su mayoría en heterocigosis en los individuos analizados, se reporta como variante rara debido a su baja frecuencia; según el reporte de la base de datos GenomAD, se observa una mayor frecuencia en población europea.

En un estudio donde se investigó la asociación del factor von Willebrand y el factor VIII, se analizaron los exones 18 al 23, y se reportaron las variantes p.Thr789Ala, p.Tyr795Tyr y p.Arg960Arg como polimorfismos posiblemente comunes, se asoció la variante p.Arg852Gln como posible causa de disminución con el factor VIII, pero no hubo una correlación significativa. Aunque esta región es de suma importancia para la unión del factor VIII con von Willebrand, las variantes encontradas no afectaron de forma patogénica, por lo que se las considera variantes benignas (Repressé et al., 2019).

En el exón 28 se observa una alta concentración de variantes, lo que ha sido considerado una “zona caliente” del gen. Dentro de este exón se identificaron las variantes p.Pro1265Pro (c.3795G>A), con frecuencia en poblaciones europea y nigeriana, encontrada en uno de los individuos estudiados; y p.Thr1381Ala (c.4141A>G), encontrada en cinco de seis pacientes, con frecuencia similar en Reino Unido, Estados Unidos y Japón. Se identificaron también las variantes p.Val1439Glu (c.4316 T>A), p.Asp1472His (c.4414G>C) con frecuencia en población caucásica y también afroamericana; la variante p.Thr1547Thr (c.4641T>C) posee frecuencia poblacional en Reino Unido y Japón, cada una en un individuo (Woods et al., 2019).

La variante p.Val1555Ala (c.4665A>C) fue hallada en dos pacientes y, por último, la variante

p.Val1565Leu (c.4693G>T) fue encontrada con frecuencia poblacional en población europea; este polimorfismo fue encontrado en solo un individuo (Woods et al., 2019). Dentro de este conjunto de variantes en el exón 28, el polimorfismo más frecuente es p.Thr1381Ala, encontrado en cinco de seis individuos, variable conocida por su frecuencia, reportada como benigna. En todas las muestras se encuentra en estado heterocigoto. Este conjunto de variantes se encuentra en la región del dominio A1 del gen, el cual cumple un rol importante en la adhesión plaquetaria por medio de la interacción con una de las glicoproteínas del complejo plaquetario Ib, según un estudio realizado en población latinoamericana las variantes poseen baja asociación con el riesgo de la enfermedad von Willebrand (Woods et al., 2019).

Pasando a las últimas regiones del gen, en el exón 34 se identificó la variante p.Glu1938Asp (5814G>C) en cuatro de seis pacientes. Aunque es una variante con frecuencia poblacional desconocida, su frecuencia fue alta entre las muestras analizadas.

En el exón 35, p.Cys1948Cys (c.5844 C>T) fue encontrado en tres individuos. En el exón 37 se identificaron las variables p.Thr2115Thr (c.6345T>A) y p.Arg2185Gln (c.6554 G>A), variante con frecuencia poblacional afroamericana y nigeriana, ambas encontradas en un mismo individuo, son variables poco frecuentes, pero sin asociación patogénica (Woods *et al.*, 2019). Los exones 34, 35 y 37 corresponden al dominio D4, que se encarga del ensamblaje de multímeros. En el exón 39, p.Thr2282Thr (c.6846A>G), encontrada en dos individuos, ambos en estado heterocigoto, esta variante no se ha reportado en la página ClinVar y VarSome no posee publicaciones ni datos de frecuencia poblacional; solo la clasifica como cambio sinónimo, probablemente benigno. Es necesario indagar más sobre estas variantes en diferentes bases de datos.

Las últimas variantes encontradas son: p.Asn2357Ile (c.7070A>T) en el exón 41; en el exón 42 encontramos p.Thr2413Thr (c.7239T>C); y el último reporte de variante polimórfica se encuentra en el exón 49, p.Gly2705Arg (c.8113G>A), encontrado principalmente en poblaciones afroamericana, caucásica y nigeriana (Woods *et al.*, 2019). Las variantes de los exones 41 y 42 se encuentran principalmente en estado heterocigoto. Los exones 39, 41 y 42 se encuentran dentro del dominio C1-C2, que participa directamente en la interacción del colágeno con FVW. Luego, el exón 49 se encuentra en una de las regiones más terminales, donde abarca el dominio C6, que participa en el ensamblaje de VWF y su secreción.

Polimorfismo en regiones intrónicas:

También se encontraron variantes genéticas en las regiones intrónicas del gen; son un total de 39 polimorfismos localizados desde el intrón 1 hasta el intrón 51 del gen. Cabe destacar que la mayoría de las variantes encontradas se repitieron en varios pacientes; se hallaron homocigotas, pero predominaron las heterocigotas, lo que también respalda la clasificación benigna y no patogénica.

Así como en los polimorfismos de los exones, encontramos la llamada “zona caliente”; esta zona también se observó en los intrones, pero en el intrón 22, donde se concentró la mayor cantidad de variantes. También otros intrones presentan agrupaciones de variantes, aunque en menor cantidad. Estos intrones son: 6, 12, 15, 24, 38, 40 y 41. Los demás intrones solo tienen una variante cada uno.

Según lo encontrado utilizando la herramienta Mutation Taster, las 39 variantes encontradas son clasificadas como polimorfismos benignos; esto demuestra que, aun en la “zona caliente” donde se concentra la mayor cantidad de variantes, no se encontró una variante patogénica. La mayoría de las variantes están clasificadas con un número rs, número que se utiliza para marcar los SNP identificados, once de las variantes localizadas no cuentan con el rs identificador, algunos porque son deleciones, y otros pueden resultar en identificaciones nuevas dentro de lo ya estudiado o solamente variantes raras.

CONCLUSIONES

- El análisis molecular realizado en regiones codificantes, uniones intrón-exón, región promotora 5' y región 3' del gen VWF en seis pacientes del noreste de Uruguay permitió identificar cambios patogénicos previamente reportados en otras investigaciones como causa genética de la enfermedad de von Willebrand, así como diversas variantes polimórficas en intrones y exones.
- Las variantes patogénicas identificadas se localizan en los exones 19, 20 y 28 del gen. Estas regiones abarcan dominios funcionales relevantes en la interacción con el factor VIII, las uniones de colágeno y las plaquetas. Los cambios en estas regiones implican coincidencias con artículos ya publicados, lo que aporta robustez a nuestros resultados.
- En conjunto, el estudio contribuye al conocimiento genético de la enfermedad de von Willebrand, permitiendo diagnosticar con mayor precisión a los pacientes; también incrementa el conocimiento sobre la variabilidad del acervo genético en Uruguay y sirve de base para nuevos estudios.

BIBLIOGRAFÍA

Bellissimo, D. B., Christopherson, P. A., Flood, V. H., Gill, J. C., & others. (2012). *VWF mutations and new sequence variations identified in healthy controls are more frequent in the AfricanAmerican population. Blood*, 119(9), 2135–2140. <https://doi.org/10.1182/blood-201110384610>

Bloom, AL. (1991). "Von Willebrand Factor: Clinical Features of Inherited and Acquired Disorders." *Mayo Clinic Proceedings* 66(7): 743–51.

Ceresetto, JM. (2017). Fisiología de la hemostasia Introducción general. Servicio de Hematología Hospital Británico de Buenos Aires. HEMATOLOGÍA. Volumen N° 21 Extraordinario:4-6. Fisiología de la hemostasia normal, Agosto 2017. [Archivo PDF] Recuperado en: <https://sah.org.ar/revistasah/numeros/vol21/extra/04-Vol%2021-extra.pdf>

Cumming, A., Grundy, P., Keeney, S., Lester, W., & others. (2006). An investigation of the von Willebrand factor genotype in UK patients diagnosed to have type 1 von Willebrand disease. *Thrombosis and Haemostasis*, 96(5), 630–641. <https://doi.org/10.1160/TH06-07-0383>

Christopherson PA, Tijet N, Haberichter SL, Flood VH, Ross J, Notley C, Rawley O, Montgomery RR; Zimmerman Project Investigators; James PD, Lillicrap D. (2023). The common VWF variant p.Y1584C: detailed pathogenic examination of an enigmatic sequence change. *J Thromb Haemost.* Mar;22(3):666-675. doi: 10.1016/j.jtha.2023.11.016. Epub 2023 Nov 30. PMID: 38040335; PMCID: PMC10922911.

Favaloro, EJ. (2014). Diagnosing von Willebrand disease: a short history of laboratory milestones and innovations, plus current status, challenges, and solutions. *Semin Thromb*
Federación de Hemofilia de América. (2025). Von Willebrand's disease. Hemophilia Federation of America. Recuperado en: https://www.hemophiliamed.org/es/disease_type/vonwillebrands-disease

Goodeve AC. (2010). The genetic basis of von Willebrand disease. *Blood Rev.* May;24(3):123-

34. doi: 10.1016/j.blre.2010.03.003. Epub 2010 Apr 20. PMID: 20409624.

González H, Herraiz R, Cristóbal, Moreno JL. (2021). Unidad de Hemato-Oncología Infantil. Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Valladolid. *Pediatría Integral* N°5- Julio-Agosto.

Recuperado

en:

<https://www.pediatriaintegral.es/publicacion-2021-07/enfermedad-de-von-willebrand-y-otros-trastornos-frecuentes-de-la-coagulacion/>

gnomAD. (s.f.). *Variant 12-6026000 T > C* [Base de datos]. Broad Institute.

<https://gnomad.broadinstitute.org/>

Hernández E, Zavala C, Quintana S, Reyes E. (2015) Enfermedad de von Willebrand, biología molecular y diagnóstico. *Von Willebrand disease. Molecular biology and diagnosis*.

ELSEVIER.[Imagen] Vol. 83. Núm. 3. Páginas 255-264. DOI: 10.1016/j.circir.2015.05.010

Hernandez J, Dominguez VM, Garcia J, Moreno M, Carmona PI, Alvarado JA, Espejo G, Espinoza J, Majluf K, Arreola R, Cruz P, Ortiz G, Sanchez B, Rodriguez C, Sosa RE, Gomez P, Campos G, Majluf A. (2024). A Ten-Year Experience with the Diagnosis of Von Willebrand Disease in Mexico Based on a Cost-Effective Strategy. *Arch Med Res*. 2025 Feb;56(2):103113. doi: 10.1016/j.arcmed.2024.103113. Epub 2024 Nov 22. PMID: 39579688.

James PD, Notley C, Hegadorn C, Leggo J, Tuttle A, Tinlin S, Brown C, Andrews C, Labelle A, Chirinian Y, O'Brien L, Othman M, Rivard G, Rapson D, Hough C, Lillicrap D. (2007). The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease: Results from a Canadian cohort study. *Blood*. Jan 1;109(1):145-54. doi: 10.1182/blood-2006-05-021105. PMID: 17190853.

Johnsen, J. M., Auer, P. L., Morrison, A. C., Jiao, S., et al. (2013). Common and rare von Willebrand factor (VWF) coding variants, VWF levels, and factor VIII levels in African Americans and European Americans. *Blood*, 122(4), 590–597. Recuperado en:

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3724194/>

Kopanos C, et al. (2019). *VarSome: the human genomic variant search engine*.

Bioinformatics, 35(11):1978–1980. [Conjunto de datos]. <http://varsome.com>

Krahforst A, Yadegari H, Pavlova A, Pezeshkpoor B, Müller J, Pötzsch B, Scholz U, Richter H, Trobisch H, Liebscher K, Olivieri M, Trautmann-Grill K, Knöfler R, Halimeh S, Oldenburg J. (2024). Unravelling the spectrum of von Willebrand factor variants in quantitative von Willebrand disease: results from a German cohort study. *J Thromb Haemost.* Nov;22(11):3010-3034. doi: 10.1016/j.jtha.2024.06.026. Epub 2024 Jul 11. PMID: 39002731.

Lillicrap, D. (2013). "Von Willebrand Disease: Advances in Pathogenetic Understanding, Diagnosis, and Therapy." *Blood* 122(23): 3736–40.

Lillicrap, D & Paula James. (2009). "Enfermedad de von Willebrand: introducción para médicos de atención Primaria." *Tratamiento de la hemofilia. Federación Mundial de Hemofilia.* (47): 5–6.

Michiels JJ, Gadisseur A, van der Planken M, Schroyens W, Berneman Z. (2009). Laboratory and molecular characteristics of recessive von Willebrand disease type 2C (2A subtype IIC) of variable severity due to homozygous or double heterozygous mutations in the D1 and D2 domains. *Acta Haematol.* 121(2-3):111-8. doi: 10.1159/000214851. Epub 2009 Jun 8. PMID: 19506357. Recuperado en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19506357/>

Peerlinck K, Eikenboom JC, Ploos Van Amstel HK, Sangtawesin W, Arnout J, Reitsma PH, Vermeylen J, Briët E. A patient with von Willebrand's disease characterized by a compound heterozygosity for a substitution of Arg854 by Gln in the putative factor-VIII-binding domain of von Willebrand factor (vWF) on one allele and very low levels of mRNA from the second vWF allele. *Br J Haematol.* (1992). Mar;80(3):358-63. doi: <https://doi.org/10.1111/j.13652141.1992.tb00111.x>. PMID: 1581215.

Repeššé, Y., Costa, C., Palla, R., Farrokhi Moshai, E., Borel-Derlon, A., D'Oiron, R., & Lacroix-Desmazes, S. (2019). Role of factor VIII-binding capacity of endogenous von Willebrand factor in the development of factor VIII inhibitors in patients with severe hemophilia A. *Haematologica*, 104, e369–e371. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.212001>
Rodeghiero, F., Castaman, G., & Dini, E. (1987). "Epidemiological Investigation of the Prevalence of von Willebrand's Disease." *Blood* 69(2): 454–59.

Sadler JE. (1998). Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:395-424. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.395. PMID: 9759493. Recuperado en: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.biochem.67.1.395>

Sadler B, Christopherson PA, Haller G, Montgomery RR, Di Paola J. (2021). Von Willebrand factor antigen levels are associated with burden of rare nonsynonymous variants in the VWF gene. *Blood.* Jun 10;137(23):3277-3283. doi: 10.1182/blood.2020009999. Erratum in: *Blood.* 2022 Sep 15;140(11):1327. doi: 10.1182/blood.2022016435. PMID: 33556167; PMCID: PMC8351900.

Shahbazi S, Alavi S, Mahdian R. (2012). Classification of exon 18 linked variants of VWF gene in von Willebrand disease. *Int J Mol Epidemiol Genet.* Epub 2012 Feb 29. PMID: 22493754; PMCID: PMC3316446.

Williams, S. R., Hsu, F.-C., Keene, K. L., Chen, W.-M., & *et al.* (2017). Shared genetic susceptibility of vascular-related biomarkers with ischemic and recurrent stroke. *Stroke*, 48(6), 1444–1450. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.015677>

World Federation of Hemophilia. (2025). World Federation of Hemophilia Report on the Annual Global Survey 2024. Montréal, Québec H3B 1K1Canada.
Recuperado en: <https://www1.wfh.org/publications/files/pdf-2588.pdf>

Woods AI, Sánchez-Luceros A, Meschengieser S, Kempfer A, Blanco A, & Lazzari M (2011). Diagnosis and management of von Willebrand disease in a single institution of Argentina.

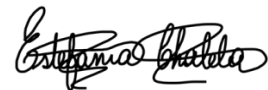
Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 37 (5), 505–511. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1295635>

Woods, A. I., Paiva, J., Lazzari, M. Á., & Sánchez-Luceros, A. (2019). *Frequent genetic variants of von Willebrand factor: their influence in the laboratory and the clinic*. Acta Bioquímica Clínica

Latinoamericana, 53(2), 183-192.

<https://www.redalyc.org/journal/535/53560335002/html/>


YASSER VENTURA VEGA REQUENA
FECHA: 2025.12.15 | 10:29:24 -03:00
SEÑALIZACIÓN DIGITAL
FIRMA RESPALDADA POR

Estefanía Chalela



Prof.

Adj. Dr. Maximiliano Berro
Unidad Académica de Hemoterapia y Medicina Transfusional
Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Udelar