

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND

Luciano Baronciani

Centro de hemofilia y trombosis Angelo Bianchi Bonomi
Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico
Fundación Luigi Villa
Milán, Italia

Anne Goodeve

Departamento de infecciones, inmunidad y enfermedad
cardiovascular
Escuela de medicina de la Universidad de Sheffield
Sheffield, Reino Unido

Flora Peyvandi

Centro de hemofilia y trombosis Angelo Bianchi Bonomi
Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico
Fundación Luigi Villa
Departamento de fisiopatología y trasplantes
Università degli Studi di Milano
Milán, Italia



FMH

FEDERACIÓN MUNDIAL DE HEMOFILIA
FÉDÉRATION MONDIALE DE L'HÉMOPHILIE
WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA

Este documento fue encargado por la Federación Mundial de Hemofilia (FMH) y originalmente publicado por John Wiley & Sons Ltd, en el periódico *Haemophilia*

Baronciani, L., Goodeve, A. and Peyvandi, F. (2017), Molecular diagnosis of von Willebrand disease. *Haemophilia*, 23: 188–197. doi:10.1111/hae.13175

Se reimprime con su autorización. © John Wiley & Sons Ltd. 2017

Este texto fue traducido del inglés por Rosa María Dueñas-Ríos. La FMH desea agradecer a la Dra. Adriana Linares, Profesora de la Universidad Nacional de Colombia, Hematóloga pediátrica en HOMI y la Clínica Infantil Colsubsidio, por haber revisado la traducción de esta monografía al español.

La FMH alienta la redistribución de sus publicaciones por organizaciones de hemofilia sin fines de lucro con propósitos educativos. Para obtener la autorización de reimprimir, redistribuir o traducir esta publicación comuníquese con el Departamento de programas y educación de la FMH, a la dirección indicada abajo.

Esta publicación se encuentra disponible en formato PDF en la Plataforma de aprendizaje electrónico de la FMH, en: **eLearning.wfh.org**

También pueden solicitarse copias adicionales a la siguiente dirección:

Federación Mundial de Hemofilia
1425, boul. René-Lévesque O. Bureau 1010
Montreal, Quebec H3G 1T7 Canadá
Tel.: (514) 875-7944
Fax: (514) 875-8916
Correo-e: wfh@wfh.org
Internet: www.wfh.org

El objetivo de la serie *Tratamiento de la hemofilia* es proporcionar información general sobre el tratamiento y manejo de la hemofilia. La Federación Mundial de Hemofilia no se involucra en el ejercicio de la medicina y bajo ninguna circunstancia recomienda un tratamiento en particular para individuos específicos. Las dosis recomendadas y otros regímenes de tratamiento son revisados continuamente, conforme se reconocen nuevos efectos secundarios. La FMH no reconoce, de modo explícito o implícito alguno, que las dosis de medicamentos u otras recomendaciones de tratamiento en esta publicación sean las adecuadas. Debido a lo anterior se recomienda enfáticamente al lector buscar la asesoría de un consejero médico y/o consultar las instrucciones impresas que proporciona la compañía farmacéutica antes de administrar cualquiera de los medicamentos a los que se hace referencia en esta monografía. Las afirmaciones y opiniones aquí expresadas no necesariamente representan las opiniones, políticas o recomendaciones de la Federación Mundial de Hemofilia, de su Consejo Directivo o de su personal.

Editor de la serie *Tratamiento de la hemofilia*: Dr. Johnny Mahlangu



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Diagnóstico molecular de la enfermedad de von Willebrand

LUCIANO BARONCIANI*, ANNE GOODEVE‡ y FLORA PEYVANDI*†

* Centro de hemofilia y trombosis Angelo Bianchi Bonomi, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico y Fundación Luigi Villa; †Departamento de patofisiología y trasplantes, Università degli Studi di Milano, Milán, Italia

‡Departamento de infecciones, inmunidad y enfermedad cardiovascular, Escuela de medicina de la Universidad de Sheffield, Sheffield, Reino Unido.

El papel de la caracterización molecular en el diagnóstico de la EvW no es indispensable si se ha investigado exhaustivamente a los pacientes mediante el uso de análisis fenotípicos. Por otro lado, si algunos de estos ensayos fenotípicos no estuvieran disponibles, la identificación de la mutación causante del trastorno podría ser crucial para un diagnóstico exacto. No obstante, hay varias razones para realizar análisis moleculares en pacientes bien caracterizados fenotípicamente; por ejemplo, identificar la mutación causante de la EvW podría ser útil para los pacientes y sus familiares cuando se necesita un diagnóstico prenatal (tipo 3 ó tipo 2 grave).

En este trabajo informamos sobre las técnicas usadas para la caracterización molecular de pacientes que se sospecha padecen EvW. Describimos el uso de bases de datos en línea para el FvW y el uso de bases de datos en línea para variaciones de un solo nucleótido (SNV por sus siglas en inglés); Las primeras para verificar si la mutación de un candidato ha sido previamente identificada en otros pacientes con EvW, y las segundas para determinar si se ha informado de una mutación putativa previa en personas sanas. Hicimos una lista de las herramientas de análisis *in silico* disponibles para determinar el pronóstico de patogenicidad de la variante de una secuencia y para establecer su posible efecto negativo en el proceso normal de corte y empalme. Informamos también sobre la estrategia que puede usarse para identificar mutaciones de pacientes con EvW tipo 2 en sujetos que han sido plenamente caracterizados mediante el uso de ensayos fenotípicos.

Palabras clave: enfermedad de von Willebrand, factor von Willebrand, caracterización molecular, análisis de secuencias de ADN, análisis secuencial de nueva generación, NGS, amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples, MLPA.

Introducción

El papel de la caracterización molecular en el diagnóstico de la EvW

La importancia de la caracterización molecular en el diagnóstico de pacientes con EvW es inversamente proporcional al número y la calidad de los ensayos fenotípicos realizados en el laboratorio. Si se utilizan todos los ensayos de FvW [1], la identificación de los defectos moleculares solamente confirmará el diagnóstico fenotípico del paciente. Por otro lado, si algunos de estos ensayos fenotípicos no estuvieran disponibles

—por ejemplo, el ensayo de unión FvW-FVIII (FvW:FVIIIIB), la aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina (RIPA por sus siglas en inglés), o el análisis de multímeros—, entonces la identificación de la mutación causante de la EvW resultará crucial para el diagnóstico del paciente.

El ensayo FvW:FVIIIIB puede ofrecer un diagnóstico diferencial entre hemofilia leve y EvW tipo 2N (Normandía). Sin embargo, el ensayo no se encuentra disponible en muchos laboratorios; por ende, el análisis secuencial de ADN de los exones del gene del FvW (*FvW*) que codifican los dominios D'D3 puede ser una valiosa alternativa al uso del ensayo FvW:FVIIIIB.

Los pacientes con EvW tipos 2B y 2A (IIA) pueden presentar parámetros fenotípicos similares. El ensayo RIPA, realizado utilizando plasma rico en plaquetas, evalúa la afinidad del FvW para unirse al receptor plaquetario de la glicoproteína (GP) Iba, lo cual permite un diagnóstico diferencial entre los tipos 2B y 2A (IIA) de la EvW. No obstante, si el ensayo RIPA no estuviera disponible, o si solo hubiera disponible plasma congelado del paciente, puede usarse el análisis secuencial de ADN del exón del FvW que codifica el dominio A1 (tipo 2B) o el dominio A2 (tipo 2A/IIA) a fin de establecer el diagnóstico

Dirección de correspondencia: Flora Peyvandi
Centro de hemofilia y trombosis Angelo Bianchi Bonomi, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico y Fundación Luigi Villa; Departamento de fisiopatología y trasplantes, Università degli Studi di Milano, Milán, Italia
Via Pace 9, 20122 Milano Italia
Tel: 39 02 5503 4456; Fax: 39 02 5410 0125; correo-e: flora.peyvandi@unimi.it

Aceptado previa revisión, el 11 de diciembre de 2016

del paciente. Aun con un ensayo de RIPA aumentado debería realizarse un análisis secuencial de ADN porque el fenotipo similar al tipo 2B también podría ser causado (aunque con menor frecuencia) por mutaciones de ganancia de función en el gene GPIba (*GP1BA*). La identificación de mutaciones en el dominio A1 del FvW (EvW tipo 2B) o en el gene *GP1BA* (pseudovon Willebrand) es una alternativa válida a las pruebas de mezclas de plaquetas [1] necesarias para el diagnóstico diferencial.

También en el caso de la EvW tipo 2A (IIA) y 2M, los pacientes pueden presentar parámetros fenotípicos similares (por ejemplo, actividad marcadamente reducida del FvW:RCO o de otra actividad del FvW dependiente de las plaquetas, en comparación con el nivel de FvW:Ag y del ensayo RIPA disminuido) y el diagnóstico fenotípico podría ser difícil si el análisis de multímeros no estuviera disponible. Una vez más, el análisis molecular puede usarse para obtener, en la gran mayoría de los casos, el diagnóstico del paciente al investigar la codificación del exón 28 en el dominio A1 (EvW tipo 2M) o el dominio A2 (EvW tipo 2A/IIA).

No obstante, existen varias razones para también realizar un análisis molecular en pacientes bien caracterizados fenotípicamente y diagnosticados con EvW. El diagnóstico de la EvW tipo 3 puede hacerse usando un ensayo confiable de FvW:Ag. Sin embargo, la identificación del estatus de portador entre los miembros de una familia podría ser incierta si se utiliza el método fenotípico, mientras que puede determinarse fácilmente una vez que se haya(n) identificado la(s) mutación(es) del probando.

La identificación de grandes deleciones homocigotas en la EvW tipo 3 constituye un factor de riesgo importante para la aparición de aloanticuerpos anti-FvW [2,3] y estos defectos siempre deberían investigarse en pacientes que no han recibido tratamiento previamente. Podría requerirse diagnóstico prenatal (DPN) o diagnóstico preimplantación en casos de EvW tipo 3, especialmente en casos en los que los padres ya tienen un hijo gravemente afectado; este diagnóstico podría basarse en el análisis de ADN de vellosidades coriónicas/amniocitos o células embrionarias. Además, en familias con casos graves de EvW tipos 1 ó 2, el método molecular puede usarse fácilmente para realizar análisis posnatales [4-6].

El factor von Willebrand, su gene, pseudogene, transcripción del ARNm, dominios funcionales del pro-FvW y su compleja biosíntesis

El gene del FvW se localiza en el cromosoma 12 y contiene 52 exones con una longitud de cerca de 178 kilobases (kb) [7]. Un pseudogene parcial no procesado del FvW (*VWFPI*, exones 23-34), homólogo del gene en un 97%, se ha ubicado en el cromosoma 22 [8]. La transcripción del FvW genera un ARNm de aproximadamente 8.7 kb. El FvW se sintetiza en células endoteliales y megacariocitos como polipéptido precursor de 2,813 aminoácidos (pre-pro-FvW), entre ellos un péptido señal de 22 residuos, un propéptido de 741 residuos,

y una subunidad madura de 2050 residuos [7]. El pro-FvW (260 kD) está organizado en repeticiones de dominios homólogos (D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK) [9,10] para los que se han identificado funciones específicas (Figura 1). El propéptido y los dominios D1-D2 participan en el proceso de formación de multímeros y en la localización del FvW en organelas de almacenamiento; los dominios D'-D3 presentan un sitio de unión para el factor VIII (FVIII) y participan de manera importante en la formación de multímeros del FvW. El dominio A1 es el único sitio de unión conocido para el receptor plaquetario GPIba; además, el dominio A1 también ofrece un sitio de unión para el colágeno tanto tipo IV como tipo VI. En el dominio A2 se encuentra el sitio de escisión para la proteína ADAMTS13 (definida como *una desintegrina y metaloproteasa con motivo trombospondina tipo 1, número 13*) [11]. El dominio A3 es el sitio de unión para el colágeno fibrilar tipos I y III. El dominio C4, que incluye la secuencia RGD, es el sitio de unión para la integrina α Ib β 3 (GPIIb/IIIa). Se requiere una compleja biosíntesis postraduccional a fin de obtener multimericos del FvW. Después de la translocación en el retículo endoplasmático, el péptido señal se escinde y el pro-FvW se dimeriza mediante enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína de la región C-terminal del dominio CK [12]. La multimerización continua en el aparato de Golgi, donde los dímeros, mediante enlaces disulfuro en la región N-terminal de las subunidades (dominios D' y D3), forman multímeros que pueden superar 20,000 kD. El propéptido, que se escinde antes de la secreción de la proteína, desempeña un papel clave en el ensamblado o alineamiento de los multímeros del FvW [13] y para encauzar el FvW hacia las organelas de almacenamiento (cuerpos de Weibel-Palade de células endoteliales o gránulos α de plaquetas) [14,15]. Lenting *et al.* recientemente presentaron un informe actualizado sobre el complejo proceso de biosíntesis, secreción y aclaramiento del FvW [16].

Técnicas usadas en la caracterización molecular de pacientes con enfermedad de von Willebrand

Uso de ADN genómico en comparación con ARNm

Generalmente, la búsqueda de una mutación se realiza usando ADN genómico, ya sea a través de amplificación de los exones del FvW mediante un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) seguido de secuenciación con el método Sanger o, más recientemente, secuenciación de ADN de nueva generación (NGS por sus siglas en inglés). También puede utilizarse el ARN mensajero (ARNm) aislado de las plaquetas del paciente. No obstante, la inestabilidad de estas últimas muestras y las técnicas más laboriosas necesarias para obtenerlas a menudo reducen el uso del análisis del ARNm. Esta estrategia generalmente se aplica para evaluar posibles mutaciones de corte y empalme o mutaciones

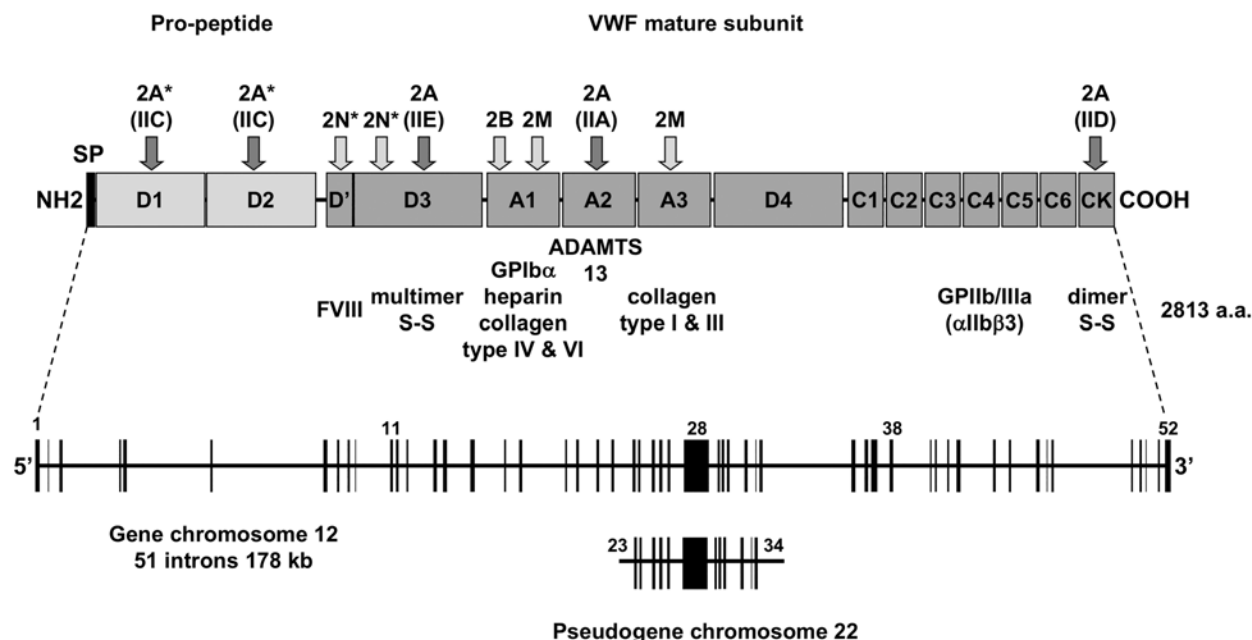


Figura 1. Estructura del precursor del factor von Willebrand (FvW), su gene y pseudogene.

La estructura esquemática del precursor del FvW (pre-pro-FvW) está formada por un péptido señal (1–22 residuos), un propéptido (23–763 residuos) y una subunidad madura (764–2,813 residuos). El pro-FvW está organizado en repeticiones de dominios estructurales homólogos (A, C y D). Se muestran los sitios de unión del FvW con el factor VIII, la glicoproteína plaquetaria (GP) Iba, el colágeno, la glicoproteína plaquetaria GPIIb/IIIa (α Ib β 3) y el sitio de escisión de la proteína ADAMTS13. Las flechas muestran las posiciones de las mutaciones que causan la enfermedad de von Willebrand (EvW) tipo 2. Las flechas oscuras muestran la ubicación de mutaciones que corresponden a las variantes del tipo 2A de la EvW con patrones multiméricos característicos debido al incremento de la proteólisis (IIA) o al alineamiento defectuoso del multímero causado por mutaciones en el propéptido (IIC), el dominio del nudo de cisteína (IID) o el dominio D3 (IIE). Las variantes recesivas de la EvW tipo 2 se señalan con un asterisco (*).

intrónicas identificadas en potenciales áreas de regulación. El estudio del ARNm puede realizarse en pacientes con EvW cuando previamente no se identificaron mutaciones después de la evaluación a nivel exónico del ADN. Este método es razonable en pacientes con EvW tipos 3 ó 2 (con historial familiar comprobado de hemorragias), pero no en casos de EvW tipo 1 en los que las mutaciones no siempre se identifican. En este caso, una secuencia alterna de ARNm, debida a la alteración de corte y empalme generada por un posible cambio secuencial intrónico profundo, podría encontrarse a nivel del ARNm. La identificación de la alteración de corte y empalme no siempre es posible dado que anteriormente se ha informado de la desintegración del ARNm en pacientes con EvW que presentan codones de terminación prematuros [17–19].

Análisis directo de secuencias de ADN (método Sanger)

El método Sanger permite establecer la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN (análisis directo de secuencias de ADN). Esta técnica es la más frecuentemente adoptada para la identificación de mutaciones del FvW. No obstante, la nueva tecnología de NGS está reduciendo el uso de la secuenciación con el método Sanger. Actualmente, debido al costo de la NGS, el uso del método Sanger sigue siendo conveniente

en casos en los que la búsqueda de la mutación está restringida a exones específicos del FvW (i. e.: las dos variantes más comunes de la EvW tipo 2). Asimismo, esta nueva técnica todavía no se encuentra ampliamente disponible y por ende su uso se limita a los laboratorios genéticos más avanzados. Para la investigación de toda la región codificante del FvW, junto con las regiones intrónicas que la flanquean, las regiones 5' y 3' no traducidas y una parte del promotor, el uso de la secuenciación con el método Sanger toma mucho tiempo, principalmente debido al gran tamaño de la región codificante del gene en sí mismo (8,442 bp). Esto ha dificultado la caracterización molecular de pacientes con EvW tipos 1 y 3, en comparación con el tipo 2, en el que el análisis de las mutaciones a menudo se realiza para regiones específicas del FvW. La secuenciación directa está disponible en muchos laboratorios y está particularmente indicada para la identificación de la mutación genética en las variantes de la EvW tipo 2 (véase análisis de las variantes de la EvW tipo 2). No obstante, la secuenciación con el método Sanger no permite identificar grandes deleciones o duplicaciones heterocigotas.

Análisis secuencial de nueva generación (NGS)

El precio de métodos genéticos recientemente desarrollados, tales como la NGS, está disminuyendo rápida y

progresivamente, lo cual permite un estudio más amplio de las mutaciones del FvW a un costo muy razonable [20]. La NGS permite la investigación de toda la región codificante del FvW en poco tiempo y, por ende, este método es más adecuado para la investigación de las variantes de la EvW tipos 1 y 3. En la medida de lo posible, el estudio de las variantes del tipo 2 también puede realizarse usando esta técnica. No obstante, las muestras de ADN de los pacientes deberían enviarse a laboratorios genéticos que ya cuenten con experiencia en el uso de esta técnica a fin de controlar el costo del ensayo. El análisis puede realizarse usando ya sea amplificación mediante PCR o captura de secuencias mediante hibridación, a fin de preparar las plantillas para la NGS. Todos los *primers* (cebadores) deben estar específicamente diseñados para evitar la amplificación del FvWPI y también para prevenir la presencia de variantes de un sólo nucleótido (SNV) comunes en las secuencias de los *primers* para la PCR. Esta técnica permite la investigación del FvW en muchos pacientes, en un periodo relativamente corto. Actualmente solo está disponible en laboratorios genéticos grandes, pero su uso se está ampliando. La utilización de algoritmos de análisis de dosificación puede permitir la detección de grandes deleciones y duplicaciones heterocigotas y también pueden detectarse conversiones génicas heterocigotas. Las variantes causativas candidatas encontradas con esta técnica requieren el uso del método Sanger para confirmar las mutaciones identificadas. Recientemente se investigó a una cohorte grande de pacientes españoles con EvW usando este método [21]. El análisis de NGS comprende tres fases principales: preparación de la genoteca de ADN, amplificación clonal, y secuenciación cíclica en matrices. Cada fase puede completarse usando más de un método. Estos autores utilizaron una versión modificada del método NGS anteriormente reportado por Corrales *et al.* [20] y la confiabilidad de este método NGS ya ha sido confirmada por Fidalgo y colegas [22] en una cohorte de pacientes portugueses con EvW. En la Figura 2 se resume una representación esquemática del procedimiento de NGS.

Amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA)

Otra técnica, importante en la caracterización molecular de las variantes de la EvW, es el análisis mediante amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA por sus siglas en inglés) [23]. En el gene del FvW pueden estar presentes grandes deleciones y, más raramente, grandes duplicaciones. Se ha informado de grandes deleciones de genes en los tres tipos de la EvW. Si una deleción afecta solamente a un alelo, las técnicas basadas en la PCR no logran identificar la mutación. El método semicuantitativo de la técnica MLPA (MRC-Holland, Países Bajos) puede identificar grandes deleciones o duplicaciones de genes aun cuando estos defectos sean heterocigotos [24]. La mayoría de las grandes deleciones que se han identificado se han presentado en pacientes con EvW

tipo 3; no obstante, también se han identificado grandes deleciones dentro del marco de lectura en casos de EvW tipos 1 y 2. Esta técnica, que puede adoptarse en todos los laboratorios que utilizan el método Sanger, permite la identificación de grandes deleciones o duplicaciones de uno o más exones.

Bases de datos en línea sobre FvW

Mutaciones patológicas identificadas en el FvW

Una base de datos en línea sobre el gene del FvW está disponible a través del Comité científico y de normalización, de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH por sus siglas en inglés), en la página Internet de la Universidad de Sheffield (<http://www.vwf.group.shef.ac.uk/>, consultada en noviembre de 2016). El listado de la mutación del FvW para la base de datos está hospedado en el portal de Bases de datos sobre variantes de factor de coagulación, de la Asociación Europea para la Hemofilia y Trastornos Afines (EAHAD por sus siglas en inglés) (https://grenada.lumc.nl/LOVD2/VWF/home.php?select_db=VWF, consultado en noviembre de 2016). Cuando se descubren mutaciones de cambio de sentido, sinónimas o en el sitio de corte y empalme, es particularmente importante verificar si ya han sido previamente identificadas en otros pacientes con EvW con un fenotipo similar, que apoyen el carácter patológico de la mutación. Se puede contribuir a estas bases de datos sobre EvW enviando las nuevas mutaciones identificadas junto con información sobre el fenotipo del paciente a la siguiente dirección: <https://grenada.lumc.nl/LOVD2/VWF/submit.php> o <http://www.eahad-db.org/index.php>.

Variantes secuenciales identificadas en el FvW

Ahora existe una serie de bases de datos que enumera las SNV y su frecuencia dentro de algunos grupos poblacionales diferentes. Entre éstas se cuentan la base de datos sobre polimorfismo de un solo nucleótido dbSNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP); la base de datos de los 1,000 genomas (www.1000genomes.org); la base de datos de Exome Aggregation Consortium, ExAC (<http://exac.broadinstitute.org>) y el servidor Exome Variant, EVS (<http://evs.gs.washington.edu/EVS>), consultadas en noviembre de 2016. ExAC es particularmente útil ya que lista variantes secuenciales en aproximadamente 60,000 individuos de varias poblaciones diferentes. La posición de la SNV del FvW debe tomarse en consideración durante el diseño de los oligonucleótidos que se utilizarán en cualquiera de las técnicas mencionadas anteriormente a fin de evitar una amplificación errónea. Estas bases de datos resultan útiles para verificar si la misma mutación de cambio de sentido, sinónima o candidata en el sitio de corte y empalme ya ha sido identificada en varios individuos sanos, lo que ayuda a excluir el carácter patológico de la variante identificada.

Cuadro 1. Pronóstico del sitio de corte y empalme. Herramientas de *software* disponibles para valorar el probable impacto de una mutación en el sitio de corte y empalme en el ARNm.

Nombre del programa	Dirección de la página Internet
Splice Prediction Module	http://www.interactive-biosoftware.com/doc/alamut-visual/2.6/splicing.html
MaxEntScan (5')	http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html
MaxEntScan (3')	http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq_acc.html
NNSplice (FruitFly)	http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
GeneSplicer	http://www.cbc.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml
Human Splicing Finder	http://www.umd.edu/HSF3/
NetGene 2	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/
MIT Splice Predictor	http://genes.mit.edu/GENSCAN.html
Alternative Splice Site Predictor	http://wangcomputing.com/assp/

Utilice por lo menos tres de las herramientas pronósticas aquí reportadas para obtener un resultado de consenso. Tres de estos programas pronósticos deberían concordar, siendo necesaria una reducción mínima de 10% en la eficiencia de un sitio de corte y empalme para considerar un efecto nocivo en el corte y empalme.

Análisis *in silico*

Métodos genéticos recientemente desarrollados están empezando a utilizarse en muchos laboratorios, lo cual permite el estudio molecular más amplio de muchas y diferentes

enfermedades. La mayoría de estas herramientas de *software* puede utilizarse gratuitamente en línea y esto ha generado un rápido crecimiento en la detección de variaciones secuenciales nuevas o poco comunes. El uso del análisis *in silico* representa una valiosa herramienta para determinar la patogenicidad pronosticada de variantes secuenciales exónicas e intrónicas dentro de un presupuesto y un marco de tiempo limitados [25] [26].

Software pronóstico del sitio de corte y empalme

Varias herramientas de *software* diferentes están disponibles para valorar el posible impacto de una mutación en el sitio de corte y empalme del ARNm; los ejemplos aparecen en el Cuadro 1. Se ha informado del uso de por lo menos tres de las herramientas pronósticas recomendadas a fin de lograr un resultado de consenso. Cuando los resultados no concuerdan deberían realizarse más pronósticos con el propósito de tratar de llegar a un consenso.

Software pronóstico del aminoácido

El posible efecto dañino de una SNV en la estructura o función proteica puede valorarse usando las herramientas *in silico* listadas en el Cuadro 2. Se deberían seleccionar herramientas que utilicen diferentes tipos de algoritmos para analizar la posible patogenicidad. Debería utilizarse un mínimo de alrededor de cinco herramientas en busca de un consenso sobre la posibilidad de patogenicidad o de neutralidad.

Cuadro 2. Pronóstico de aminoácido. Herramientas de *software* disponibles para valorar el posible efecto dañino en la estructura o función proteica de una variante de un solo nucleótido (SNV). Los siguientes programas están agrupados según el tipo de herramienta. Debería utilizarse un mínimo de cinco herramientas basadas en diferentes tipos de algoritmo.

Nombre del programa	Tipo de herramienta	Dirección de la página Internet
Domain Context	Conservación evolutiva	http://pfam.xfam.org/
Domain Context	Conservación evolutiva	http://www.uniprot.org/
SNPs&GO	Aprendizaje automático (SVM)	http://snps.biofold.org/snps-and-go/
MutPred	Aprendizaje supervisado	http://mutpred.mutdb.org/
PMut	Aprendizaje supervisado	http://mmb.pcb.ub.es/pmut2017/analyses/new/
HANSA	Aprendizaje supervisado	http://www.cdfd.org.in/HANSA/
SNAP	Aprendizaje supervisado	https://roslab.org/services/snap/
Align GVGD	Secuencia/conservación evolutiva	http://agvgd.hci.utah.edu/
Panther Classification System Analysis	Secuencia/conservación evolutiva	http://www.pantherdb.org/tools/csnpscoreForm.jsp
PROVEAN	Secuencia/conservación evolutiva	http://provean.jcvi.org/genome_submit_2.php?species=human
SIFT Analysis	Secuencia/conservación evolutiva	http://sift.bii.a-star.edu.sg/
MutationAssessor	Secuencia/conservación evolutiva	http://mutationassessor.org/
PolyPhen2 Analysis	Secuencia proteica y basado en la estructura	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
SNPs 3D Analysis	Secuencia proteica y basado en la estructura	http://www.snps3d.org/
Mutation Taster	Secuencia proteica y basado en la estructura	http://www.mutationtaster.org/
Effect according to Russell	Gravedad de la sustitución del aminoácido	http://www.russelllab.org/aas/

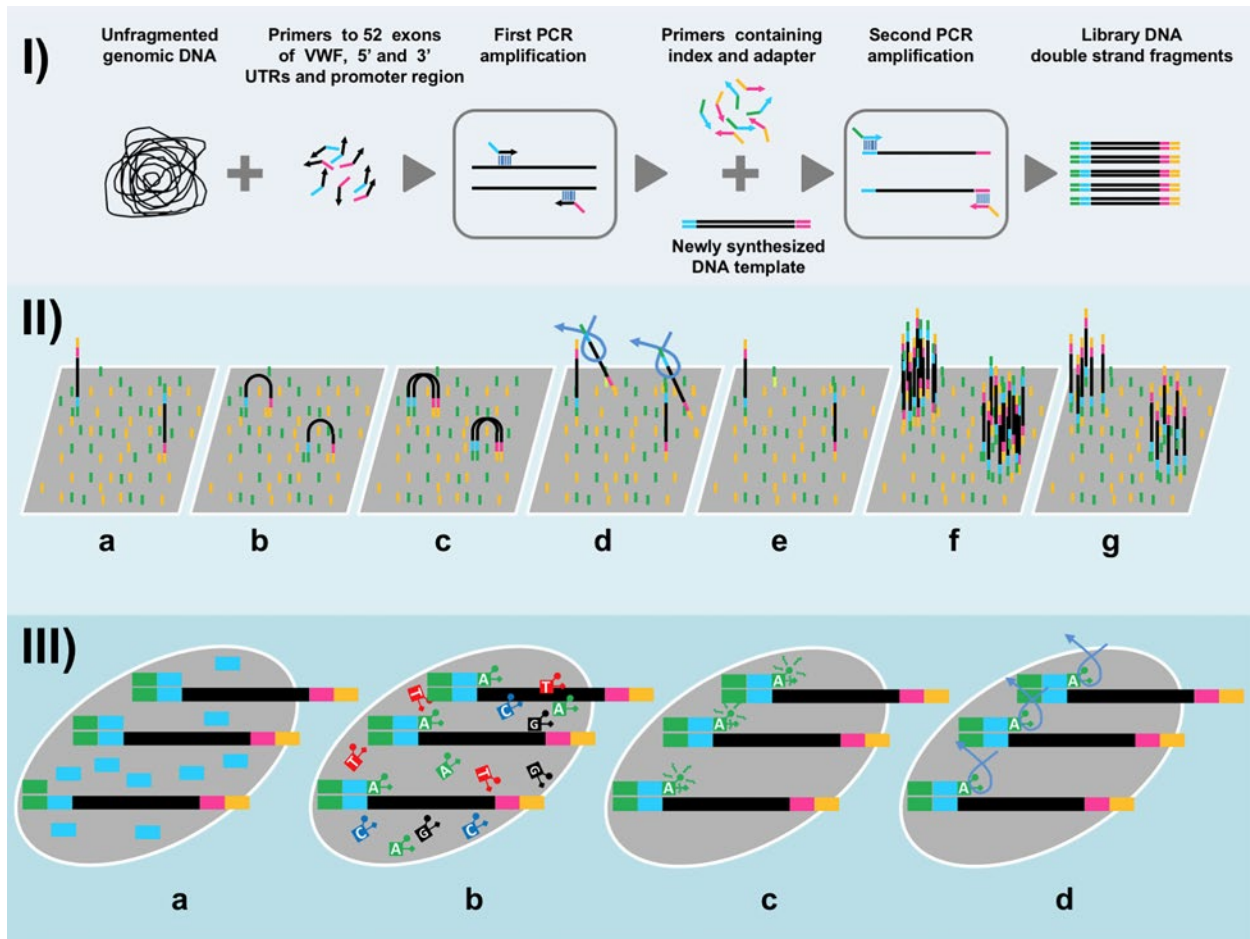


Figura 2. Representación esquemática del análisis NGS del FvW, como lo realizan Batlle *et al.* [21] para pacientes con EvW.

Fase I) La preparación de la genoteca se obtuvo usando 61 pares de oligonucleótidos *primers* para cubrir 1,300 bp de la región promotora, los 52 exones del FvW (incluyendo fronteras exón/intrón) y las regiones no traducidas 5' y 3'. La nueva síntesis de ADN de doble hebra obtenida a partir de la primera reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó como plantilla en una segunda PCR. En la segunda PCR se utilizó un nuevo conjunto de cebadores que contenía adaptadores para la plataforma NGS y un índice secuencial diferente para cada muestra, con el propósito de obtener la genoteca de ADN. Fase II) La genoteca de ADN se carga a una célula de flujo en un secuenciador de escritorio MiSeq (*Illumina*, San Diego, CA, EE.UU.) y la amplificación de clones se obtiene mediante una PCR tipo puente. Se forman fragmentos de ADN de una sola hebra hibridados a acopladores (*linkers*), a través de los adaptadores de secuencia, primero con un extremo (a) y después con ambos extremos y se forma un puente (b). Enseguida se inicia la elongación isotérmica a partir de los extremos de doble hebra del puente, con lo que se genera una hebra complementaria que se fija de manera covalente al acoplador (c). La desnaturalización del ADN de doble hebra provoca el desplazamiento de la genoteca original de ADN de una sola hebra (d). La repetición de los pasos (b) a (e) forma una colonia o conglomerado (*cluster*) de secuencias clonalmente ampliadas de copias de una sola hebra, con secuencias ya sea directas e inversas (f). Todos los fragmentos de ADN de una sola hebra inversos (o directos) se eliminan mediante escisión, de manera que en cada conglomerado todas las moléculas sean idénticas (g) y estén listas para la secuenciación. Fase III) Secuenciación por síntesis. Se agregan *primers* de secuencia (azules) a la célula de flujo y se hibridizan a ADN de una sola hebra (a). Se lavan los *primers* y se agregan nucleótidos etiquetados/químicamente modificados. Solamente se incorpora un solo nucleótido a cada conglomerado dado que el nucleótido modificado no puede alongarse (b). Después del lavado de la célula de flujo y la excitación de los nucleótidos etiquetados incorporados, la luz emitida es capturada en una imagen que identifica cuáles de los cuatro nucleótidos han sido incorporados en cada conglomerado (c). Para repetir este proceso, el nucleótido incorporado es desbloqueado químicamente y se retira el grupo etiquetado (d). La repetición de los pasos (b) a (d) permite la progresión de la reacción secuenciadora en cada conglomerado.



Figura 3. Algoritmo de caracterización molecular de pacientes con enfermedad de von Willebrand tipos 1 y 3.

VWD: Enfermedad de von Willebrand; MLPA: método de amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples; SNV: variante de un solo nucleótido; rVWF, Factor von Willebrand recombinante

Caracterización molecular de pacientes con EvW

Como se mencionó anteriormente, el papel de la caracterización molecular en el diagnóstico de la EvW no es indispensable si los pacientes han sido ampliamente investigados mediante el análisis de fenotipo. No obstante, la identificación de las mutaciones causantes de la EvW puede ser útil para pacientes y sus familiares en casos en los que se requiere un diagnóstico prenatal. En los siguientes párrafos informamos sobre la estrategia que puede utilizarse a fin de identificar las mutaciones en los pacientes que han sido totalmente caracterizados mediante los ensayos de fenotipo.

Caracterización molecular de pacientes con EvW tipos 1 y 3

El análisis molecular puede realizarse después de que los pacientes hayan sido diagnosticados con EvW tipos 1 ó 3 usando métodos fenotípicos. El método para investigar las mutaciones genéticas causantes de los tipos 1 y 3 es similar dado que –en comparación con el tipo 2, en el que la gran mayoría de las mutaciones se ubica en el exón 28 (véase la Figura 1)– no existe una zona particular donde se hayan identificado las mutaciones. Debería investigarse toda la región codificante del FvW junto con las regiones intrónicas que la flanquean, las regiones 5' y 3' no traducidas y el promotor proximal del FvW. En el caso de la EvW tipo 3, que se segrega como trastorno recesivo, ambos alelos podrían albergar mutaciones diferentes (heterocigotas compuestas) o dos copias de la misma mutación (homocigota). En el caso de la EvW tipo 1, que principalmente se segrega como trastorno dominante, solamente un alelo está afectado, a pesar de que hay informes de EvW tipo 1 debida a mutaciones heterocigotas compuestas [22,27]. Asimismo, la identificación de ambas mutaciones en pacientes con EvW tipo 3 es posible en casi todos los casos, mientras que en la EvW tipo 1 [27,28] no se identifican las mutaciones en cerca del 30% de los pacientes investigados (principalmente en aquellos en los que el nivel de FvW:Ag es mayor a 30 IU/dL). Además, las mutaciones identificadas en casos de EvW tipo 3 con frecuencia son mutaciones (de cambio de sentido, de cambio de marco de lectura y grandes

deleciones) que evidentemente provocan trastornos, mientras que en la EvW tipo 1, las mutaciones de cambio de sentido a menudo identificadas solo pueden ser consideradas mutaciones candidatas debido a la falta de pruebas sólidas de su efecto causal. La **Figura 3** muestra un algoritmo para la caracterización molecular en pacientes con EvW tipos 1 y 3.

Diagnóstico prenatal (DPN) de la EvW tipo 3

En comparación con la hemofilia, la mayoría de los pacientes con EvW presentan síntomas hemorrágicos relativamente leves. Por lo tanto, el DPN generalmente no es necesario, excepto para los casos ocasionales de tipo 2, y de familias con EvW tipo 3 con un historial clínico grave. El DPN se requiere principalmente en casos en los que ambos padres ya saben que son portadores del tipo 3 de la EvW, con defectos genéticos identificados en su primer hijo afectado con síntomas hemorrágicos graves. Anteriormente, el DPN se realizaba usando PCR de repeticiones cortas en tándem en el FvW [29]. Para detectar las mutaciones genéticas pueden usarse las técnicas de secuenciación y análisis de dosificación arriba mencionadas. Para las mutaciones conocidas, el análisis secuencial es el método predilecto; mientras que si no se conocieran las mutaciones genéticas pueden usarse los métodos NGS y, en caso necesario, MLPA [21] [24].

Caracterización molecular de pacientes con EvW tipo 2

A diferencia de los tipos 1 y 3 de la EvW, el diagnóstico molecular de las variantes del tipo 2 puede realizarse en muchos laboratorios. La caracterización de las mutaciones de la EvW tipo 2 no requiere el estudio de todo el gene del FvW, sino solamente la valoración de los exones que codifican el(los) dominio(s) funcional(es) específico(s) identificado(s) usando el método fenotípico. Esta estrategia puede aplicarse a todas las variantes del tipo 2 de la EvW (2A, 2B, 2M y 2N), si bien la valoración del tipo 2A puede resultar más compleja debido a la participación de diferentes dominios funcionales implicados en el fenotipo de estos pacientes (véase la Figura 1).

En la EvW tipo 2B, que se segrega como trastorno dominante, solo se espera una mutación. Estas mutaciones se encuentran en el dominio A1, entre p.Glu1260 y p.Gly1479,

Cuadro 3. Una estrategia para identificar los defectos moleculares en pacientes con EvW tipo 2 caracterizados bioquímicamente, utilizando métodos de secuenciación de RCP y de Sanger.

Tipo de EvW	2A(IIA)	2A(IIIE)	2A*(IIIC)	2A(IIID)	2B	2M	2M(CB)	2N*
Dominio	A2	D3	D1-D2	CK	A1	A1	A3	D'-D3
Exón(es)	extremo 3' del 28	22, 25-27 y extremo 5' del 28	2-17	51-52	extremo 5' del 28	extremo 5' del 28	29-32	17-25

Cada variante de la EvW tipo 2 surge de cambios secuenciales ubicados en un dominio funcional específico del FvW. Aunque se han reportado algunas excepciones a este modelo, la gran mayoría de las variantes identificadas encaja bien en este patrón. Las variantes recesivas (*) están presentes ya sea en forma homocigota o heterocigota compuesta. En este último caso es probable que solamente la variante de cambio de sentido sea la responsable del fenotipo de tipo 2 del paciente, mientras que el segundo defecto podría dar lugar a un alelo nulo. Solamente la variante de cambio de sentido puede identificarse usando este método, y el reconocimiento de la segunda variante requerirá la evaluación de toda la secuencia de codificación del FvW.

y están relacionadas con la unión espontánea del FvW al receptor plaquetario GPIIb α (RIPA <0.7 mg/ml). Para identificar este defecto solo se necesita la investigación del extremo 5' del exón 28. Por lo tanto, para identificar la mutación causante puede utilizarse un análisis de PCR simple, seguido de un análisis secuencial. Si no se identificara mutación alguna en el dominio A1 del FvW, a pesar de un claro aumento del ensayo RIPA obtenido del plasma rico en plaquetas del paciente, será necesario el análisis de secuenciación directa del *GPIIbA*.

La pseudo-EvW, también conocida como EvW tipo plaquetario, se debe a mutaciones de cambio de sentido o a una delección de marco de lectura en el exón 2 del *GPIIbA*. Variantes de cambio de sentido (entre p.Trp246 y p.Asp265) y una delección dentro del marco; una delección de marco de lectura de 27-bp Pro449_Ser457del (1345_1371del27) [30] ocasiona que el GPIIb α se una espontáneamente al FvW generando, como en el caso de la EvW tipo 2B, un ensayo RIPA aumentado [31].

La EvW tipo 2M también se segrega como trastorno dominante. Las mutaciones de cambio de sentido se localizan más comúnmente en el dominio A1. Estos defectos están relacionados con una disminución de la capacidad del FvW para unirse al receptor GPIIb α (FvW:RCo/FvW:Ag <0.6). Por ende, para identificar estos defectos solo es necesaria la investigación del extremo 5' del exón 28, de manera similar al caso de las variantes de la EvW tipo 2B. No obstante, en la EvW tipo 2M también se observan defectos de unión al colágeno (FvW:CB/FvW:Ag <0.6) [32,33]. En este caso, la mayoría de las mutaciones se ubica en el dominio A3, y deberían investigarse los exones 29-32. Una pequeña proporción de las mutaciones en el dominio A1 es causada por defectos de unión al colágeno tipos IV o VI [34].

La EvW tipo 2N se segrega como trastorno recesivo, por lo que es de esperarse que ambos alelos presenten mutaciones (ya sean heterocigotas compuestas u homocigotas). Las mutaciones homocigotas pueden encontrarse en pacientes nacidos de relaciones consanguíneas, pero también en poblaciones europeas debido a la elevada prevalencia de la mutación p.Arg854Gln, que con frecuencia se presenta en forma homocigota. Las mutaciones heterocigotas compuestas generalmente presentan una combinación de mutación tipo 2N con un defecto tipo 1 ó 3 en el FvW. Las mutaciones que afectan la unión del FvW al FVIII (FvW:FVIIIb) se han identificado principalmente en los primeros 272 residuos aminoácidos de la subunidad madura (dominio D' y una parte del D3, codificados por los exones 17-25), aunque se ha informado que mutaciones hasta el exón 26 presentan una unión FvW:FVIIIb ligeramente reducida. Por ende, en este tipo de EvW, la identificación de las mutaciones responsables del decremento en la unión del FvW:FVIIIb puede realizarse evaluando una región relativamente pequeña del FvW. No obstante, en el caso de pacientes que son heterocigotas para una mutación de cambio de sentido tipo 2N, la identificación del segundo defecto requiere el mismo método usado en pacientes con EvW tipos 1 y 3.

Los pacientes con EvW tipo 2A presentan un grupo heterogéneo de mutaciones ubicadas en diferentes dominios funcionales del FvW. Todas estas mutaciones afectan en diferente medida el tamaño del multímero del FvW, por lo que estos pacientes presentan una pérdida variable de multímeros de alto peso molecular (APM).

La forma más común de EvW tipo 2A se segrega como trastorno dominante y las variantes se ubican en el dominio A2, en el que se encuentra el sitio de escisión para ADAMTS13. Estas variantes, identificadas en la anterior clasificación de la EvW como IIA [35], se caracterizan por la pérdida de multímeros de tamaños grande y mediano, relacionada con el aumento de bandas de tripletes debido a una mayor susceptibilidad a la acción proteolítica de ADAMTS13. Por lo tanto, para identificar estos defectos solo se necesita investigar el extremo 3' del exón 28.

La segunda forma más común del tipo 2A de la EvW se segrega como trastorno dominante, y las variantes se ubican en el dominio D3, el cual desempeña un papel importante en la mutimerización del FvW. Estas variantes, identificadas en la anterior clasificación de la EvW como IIE [36], se caracterizan por una modesta pérdida de multímeros de APM, relacionada con la ausencia de bandas de tripletes satélites debido a una menor susceptibilidad a la acción proteolítica de ADAMTS13. Por lo tanto, para identificar estos defectos solo se necesita investigar los exones 22, 25-27 y el extremo 5' del exón 28 [37,38].

Una forma poco común de la EvW tipo 2A que también se segrega como trastorno dominante se debe a variantes ubicadas en el dominio CK, que desempeña un papel importante en la dimerización del FvW. Estas variantes, identificadas en la anterior clasificación de la EvW como IID [39], se caracterizan por la pérdida de multímeros de APM, relacionada con la presencia de bandas de tamaños "impares" en el análisis de multímeros de resolución intermedia. Por lo tanto, para identificar estos defectos solo se requiere la investigación de los exones 51-52 [39].

Una forma todavía menos común de la EvW tipo 2A, que se segrega como trastorno recesivo, se debe a variantes ubicadas en los dominios D1-D2 (propéptidos) que desempeñan un papel importante en la multimerización del FvW. Las mutaciones de los pacientes pueden ser homocigotas en los dominios D1 o D2, o heterocigotas compuestas con un segundo defecto en alguna otra parte del FvW. Estas variantes, identificadas en la anterior clasificación de la EvW como IIC [36], se caracterizan por la pérdida de multímeros de tamaños grande y mediano, relacionada con la ausencia de bandas de tripletes satélites debida a una menor susceptibilidad a la acción proteolítica de ADAMTS13. Por ende, para identificar estos defectos deberían investigarse los exones 2-17, si bien hasta la fecha se han identificado mutaciones en el dominio D1, en los exones 6-7 y en los exones 11-15 [40].

La anterior estrategia para caracterizar molecularmente las variantes del tipo 2 de la EvW se resume en el Cuadro 3.

Conclusión

El diagnóstico de la EvW puede lograrse tanto mediante análisis genético como por caracterización fenotípica del FvW. El método Sanger de análisis secuencial o la NGS pueden identificar mutaciones en la mayoría de los pacientes con enfermedad de tipos 3 y 2, pero etiologías diferentes a los defectos del FvW pueden contribuir a niveles reducidos de FvW en un tercio de los pacientes con EvW tipo 1, dado que 30% de los pacientes permanece sin mutaciones en la secuencia de codificación de la proteína de FvW. El incremento en el uso de la NGS, en combinación con el análisis de dosificación derivado de los datos de la NGS facilitará un análisis más completo del FvW para detectar mutaciones.

Nota de divulgación

LB declaró no tener intereses que pudieran percibirse como causantes de un conflicto o sesgo. AG ha recibido honorarios por su participación como ponente en simposios satélite y reuniones educativas organizadas por Octapharma y Baxalta. Recibió un patrocinio de CLS Behring para la base de datos de mutaciones de la EvW. FP ha recibido honorarios por su participación como ponente en reuniones educativas organizadas por Bayer, Grifols, Novo Nordisk y Sobi. Es receptora de financiamiento para becas de investigación de Alexion, Biotest, Kedrion Biopharma y Novo Nordisk pagadas a la Fundación Luigi Villa, y ha recibido honorarios de consultoría de Kedrion Biopharma, LFB y Octapharma. Es miembro del consejo asesor científico de Ablynx.

Autoría

LB escribió el manuscrito. FP y AG realizaron una revisión crítica del mismo. Todos los autores aprobaron la versión final presentada para publicación.

Referencias

- Nichols WL, Hultin MB, James AH, Manco-Johnson MJ, Montgomery RR, Ortel TL, Rick ME, Sadler JE, Weinstein M, Yawn BP. von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia* 2008; **14**: 171-232.
- Shelton-Inloes BB, Chehab FF, Mannucci PM, Federici AB, Sadler JE. Gene deletions correlate with the development of alloantibodies in von Willebrand disease. *J Clin Invest* 1987; **79**: 1459-65.
- Mannucci PM, Federici AB. Antibodies to von Willebrand factor in von Willebrand disease. In: Inhibitors to coagulation factors. Aledort LM, Hoyer LW, Reisner HM, White II GC, (eds). New York: Plenum Press, 1995; pp. 87-92.
- Favaloro EJ. Genetic testing for von Willebrand disease: the case against. *J Thromb Haemost* 2010; **8**: 6-12.
- Peake IR, Goodeve AC. Genetic testing for von Willebrand disease: the case for. *J Thromb Haemost* 2010; **8**: 13-6.
- Mannucci PM. Genetic testing in von Willebrand disease: a rebuttal. *J Thromb Haemost* 2010; **8**: 860-7836.
- Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Worrall NK, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, Alevy YG, Sadler JE. Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J Biol Chem* 1989; **264**: 19514-27.
- Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Lester-Mancuso TL, Le Beau MM, Sorace JM, Sadler JE. Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. *Biochemistry* 1991; **30**: 253-69.
- Shelton-Inloes BB, Titani K, Sadler JE. cDNA sequences for human von Willebrand factor reveal five types of repeated domains and five possible protein sequence polymorphisms. *Biochemistry* 1986; **25**: 3164-71.
- Zhou YF, Eng ET, Zhu J, Lu C, Walz T, Springer TA. Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood* 2012; **120**: 449-58.
- Chung DW, Fujikawa K. Processing of von Willebrand factor by ADAMTS-13. *Biochemistry* 2002; **41**: 11065-70.
- Marti T, Roesselet S, Titani K, Walsh KA. Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor. *Biochemistry* 1987; **26**: 8099-109.
- Verweij CL, Hart M, Pannekoek H. Expression of von Willebrand factor (vWF) cDNA in heterologous cells: requirement of the pro-polypeptide in vWF multimer formation. *EMBO J* 1987; **6**: 2885-90.
- Haberichter SL, Fahs SA, Montgomery RR. Von Willebrand factor storage and multimerization: 2 independent intracellular processes. *Blood* 2003; **96**: 1808-15.
- Haberichter SL, Jozwiak MA, Rosenberg JB, Christopherson PA, Montgomery RR. The von Willebrand factor propeptide (VWFpp) traffics an unrelated protein to storage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; **22**: 921-6.
- Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood* 2015; **125**: 2019-28.
- Plate M, Duga S, Baronciani L, La Marca S, Rubini V, Mannucci PM, Federici AB, Asselta R. Premature termination codon mutations in the von Willebrand factor gene are associated with allele-specific and position-dependent mRNA decay. *Haematologica* 2010; **95**: 172-4.
- Castaman G, Plate M, Giacomelli SH, Rodeghiero F, Duga S. Alterations of mRNA processing and stability as a pathogenic mechanism in von Willebrand factor quantitative deficiencies. *J Thromb Haemost* 2010; **8**: 2736-42.
- Corrales I, Ramirez L, Altisent C, Parra R, Vidal F. The study of the effect of splicing mutations in von Willebrand factor using RNA isolated from patients' platelets and leukocytes. *J Thromb Haemost* 2011; **9**: 679-88.
- Corrales I, Catarino S, Ayats J, Arteta D, Altisent C, Parra R, Vidal F. High-throughput molecular diagnosis of von Willebrand disease by next generation sequencing methods. *Haematologica* 2012; **97**: 1003-7.
- Battle J, Perez-Rodriguez A, Corrales I, Lopez-Fernandez MF, Rodriguez-Trillo A, Loures E, Cid AR, Bonanad S, Cabrera N, Moret A, Parra R, Mingot-Castellano ME, Balda I, Altisent C, Perez-Montes R, Fisac RM, Iruin G, Herrero S, Soto I, de Rueda B, Jimenez-Yuste V, Alonso N, Vilarino D, Arijia O, Campos R, Paloma MJ, Bermejo N, Toll T, Mateo J, Arribalzaga K, Marco P, Palomo A, Sarmiento L, Inigo B, Nieto MM, Vidal R, Martinez MP, Aguinaco R, Cesar JM, Ferreiro M, Garcia-Frade J, Rodriguez-Huerta AM, Cuesta J, Rodriguez-Gonzalez R, Garcia-Candel F, Cornudella R, Aguilar C, Borrás N, Vidal F. Molecular and clinical profile of von Willebrand disease in Spain (PCM-EVW-ES): Proposal for a new diagnostic paradigm. *Thromb Haemost* 2016; **115**: 40-50.
- Fidalgo T, Salvado R, Corrales I, Pinto SC, Borrás N, Oliveira A, Martinho P, Ferreira G, Almeida H, Oliveira C, Marques D, Goncalves E, Diniz M, Antunes M, Tavares A, Caetano G, Kjollerstrom P, Maia R, Sevivas TS, Vidal F, Ribeiro L. Genotype-phenotype correlation in a cohort of Portuguese patients comprising the entire spectrum of VWD types: impact of NGS. *Thromb Haemost* 2016; **116**: 17-31.

23. Cabrera N, Casana P, Cid AR, Moret A, Moreno M, Palomo A, Aznar JA. First application of MLPA method in severe von Willebrand disease. Confirmation of a new large VWF gene deletion and identification of heterozygous carriers. *Br J Haematol* 2011; **152**: 240-2.
24. Acquila M, Bottini F, DI Duca M, Vijzelaar R, Molinari AC, Bicchocchi MP. Multiplex ligation-dependent probe amplification to detect a large deletion within the von Willebrand gene. *Haemophilia* 2009; **15**: 1346-8.
25. Richards CS, Bale S, Bellissimo DB, Das S, Grody WW, Hegde MR, Lyon E, Ward BE. ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations: Revisions 2007. *Genet Med* 2008; **10**: 294-300.
26. Wallis Y, Payne S, McAnulty C, Bodmer D, Sistermans E, Robertson K, Moore D, Abbs S, Deans Z and Devereau A. ACGS & VKGL Practice Guidelines for the Evaluation of Pathogenicity and the Reporting of Sequence Variants in Clinical Molecular Genetics, 2013. Available at http://www.acgs.uk.com/media/774853/evaluation_and_reporting_of_sequence_variants_bpgs_june_2013_-_finalpdf.pdf. Accessed January 10, 2017
27. Goodeve A, Eikenboom J, Castaman G, Rodeghiero F, Federici AB, Batlle J, Meyer D, Mazurier C, Goudemand J, Schneppenheim R, Budde U, Ingerslev J, Habart D, Vorlova Z, Holmberg L, Lethagen S, Pasi J, Hill F, Hashemi SM, Baronciani L, Hallden C, Guilliatt A, Lester W, Peake I. Phenotype and genotype of a cohort of families historically diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 von Willebrand Disease (MCMDM-1VWD). *Blood* 2007; **109**: 112-21.
28. James PD, Notley C, Hegadom 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. The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease: results from a Canadian cohort study. *Blood* 2007; **109**: 145-54.
29. Standen GR, Bignell P, Bowen DJ, Peake IR, Bloom AL. Family studies in von Willebrand's disease by analysis of restriction fragment length polymorphisms and an intragenic variable number tandem repeat (VNTR) sequence. *Br J Haematol* 1990; **76**: 242-9.
30. Othman M, Notley C, Lavender FL, White H, Byrne CD, Lillicrap D, O'Shaughnessy DF. Identification and functional characterization of a novel 27-bp deletion in the macroglycopeptide-coding region of the GPIBA gene resulting in platelet-type von Willebrand disease. *Blood* 2005; **105**: 4330-6.
31. Weiss HJ, Meyer D, Rabinowitz R, Piétu G, Girma J, Vivic WJ, Rogers J. Pseudo-von Willebrand's disease: an intrinsic platelet defect with aggregation by unmodified human factor VIII/von Willebrand factor and enhanced adsorption of its high molecular weight multimers. *N Engl J Med* 1982; **306**: 326-33.
32. Ribba AS, Loisel I, Lavergne JM, Juhan-Vague I, Obert B, Chereil G, Meyer D, Girma JP. Ser968Thr mutation within the A3 domain of von Willebrand factor (VWF) in two related patients leads to a defective binding of VWF to collagen. *Thromb Haemost* 2001; **86**: 848-54.
33. Riddell AF, Gomez K, Millar CM, Mellars G, Gill S, Brown SA, Sutherland M, Laffan MA, McKinnon TA. Characterization of W1745C and S1783A: 2 novel mutations causing defective collagen binding in the A3 domain of von Willebrand factor. *Blood* 2009; **114**: 3489-96.
34. Flood VH, Schlauderaff AC, Habrichter SL, Slobodianuk TL, Jacobi PM, Bellissimo DB, Christopherson PA, Friedman KD, Gill JC, Hoffmann RG, Montgomery RR. Crucial role for the VWF A1 domain in binding to type IV collagen. *Blood* 2015; **125**: 2297-304.
35. Lyons SE, Cooney KA, Bockenstedt P, Ginsburg D. Characterization of Leu777Pro and Ile865Thr type IIA von Willebrand disease mutations. *Blood* 1994; **83**: 1551-7.
36. Zimmerman TS, Dent JA, Ruggeri ZM, Nannini LH. Subunit composition of plasma von Willebrand factor. Cleavage is present in normal individuals, increased in IIA and IIB von Willebrand disease, but minimal in variants with aberrant structure of individual oligomers (types IIC, IID and IIE). *J Clin Invest* 1986; **77**: 947-51.
37. Schneppenheim R, Michiels JJ, Obser T, Oyen F, Pieconka A, Schneppenheim S, Will K, Zieger B, Budde U. A cluster of mutations in the D3 domain of von Willebrand factor correlates with a distinct subgroup of von Willebrand disease: type 2A/IIE. *Blood* 2010; **115**: 4894-901.
38. Veyradier A, Boisseau P, Fressinaud E, Caron C, Ternisien C, Giraud M, Zawadzki C, Trossaert M, Itzhar-Baikian N, Dreyfus M, d'Oiron R, Borel-Derlon A, Susen S, Bezieau S, Denis CV, Goudemand J. A Laboratory Phenotype/Genotype Correlation of 1167 French Patients From 670 Families With von Willebrand Disease: A New Epidemiologic Picture. *Medicine (Baltimore)* 2016; **95**: e3038
39. Schneppenheim R, Brassard J, Krey S, Budde U, Kunicki TJ, Holmberg L, Ware J, Ruggeri ZM. Defective dimerization of the von Willebrand factor subunits due to a Cys>Arg mutation in type IID von Willebrand disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 3581-6.
40. Holmberg L, Karpman D, Isaksson C, Kristoffersson A-C, Lethagen S, Schneppenheim R. Ins405AsnPro mutation in the von Willebrand factor propeptide in recessive type 2A (IIC) von Willebrand's disease. *Thromb Haemost* 1998; **79**: 718-22.