

## Caracterización de variantes en el exón 28 del gen VWF y su correlación genotipo-fenotipo en una muestra de pacientes con enfermedad de Von Willebrand tipo 2

Characterization of variants in exon 28 of the VWF gene and their genotype-phenotype correlation in a sample of patients with von Willebrand disease type 2.

» Laura Katherine Parada Ferro<sup>1</sup>



» Adriana Linares Ballesteros<sup>2</sup>



» Claudia Patricia Casas Patarroyo<sup>2</sup>



» Andrea Dadeiba Rodríguez Fiquitiva<sup>2</sup>

» Claudia Suárez Molano<sup>2,4</sup>

» Luz Karime Yunis Hazbun<sup>1,3</sup>



» Juan José Yunis Londoño<sup>1,3</sup>



<sup>1</sup> Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

<sup>2</sup> Clínica Infantil Colsubsidio, Bogotá, Colombia.

<sup>3</sup> Instituto de Genética Servicios Médicos Yunis Turbay y Ca. SAS, Bogotá, Colombia.

Recibido el 03 de enero de 2025, aceptado el 13 de mayo de 2025

<https://doi.org/10.51643/22562915.729>

### Resumen

**Introducción:** la enfermedad de Von Willebrand es la coagulopatía hereditaria más común en la población, el abordaje del análisis molecular como apoyo diagnóstico ha sido limitado en la enfermedad de Von Willebrand (EvW) de tipo 2. El objetivo de este estudio es caracterizar las variantes en el exón 28 del gen VWF y realizar la correlación genotipo-fenotipo en una muestra de pacientes con EvW tipo 2. **Métodos:** se analizaron 20 muestras de pacientes previamente diagnosticados con EvW tipo 2 con edades entre 8 y 56 años. Se realizó análisis del Exón 28 del gen VWF, por amplificación, verificación por electroforesis en geles de agarosa y secuenciación con el Kit *Big Dye Terminator V3.1*. **Resultados:** se identificó la variante patogénica en 15 (88.2%) pacientes no relacionados. La variante p.Gly1609Arg fue identificada en el 52.9% de los pacientes analizados (n=9) sola o en combinación, seguido en frecuencia por p.Ile1425Phe (n=3), y p.Ala1437Thr (n=3) sola o en combinación, un paciente con p.Arg1597Trp y otro con p.Arg1334Trp. Adicionalmente, en el 31.6% (n=6) de los pacientes se

\* **Autor para correspondencia:** Laura K. Parada. Departamento de Patología, Facultad de Medicina e Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia.

**Correo electrónico:** [laura.parada.23@gmail.com](mailto:laura.parada.23@gmail.com)

Doi: <https://doi.org/10.51643/22562915.729>

Asociación Colombiana de Hematología y Oncología. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

identificaron dos variantes patogénicas (dos pacientes con p.Gly1609Arg/p.Ala1437Thr; un paciente p.Gly1609Arg/p.Ser1506Leu; un paciente p.Gly1609Arg/p.Arg1597Trp; un paciente p.Gly1609Arg/p.Val1279Phe; y un paciente p.Ile1628Thr/p.Ser1325Phe). No se identificó variante en dos pacientes (11.8%). Se pudo reclasificar el subtipo EvW tipo 2 en el 40% (n=8) de pacientes. **Conclusiones:** este es el primer estudio realizado en Colombia que permite identificar la causa genética de EvW, mediante la secuenciación de exones específicos en una cohorte de seguimiento.

**Palabras Clave:** enfermedad de Von Willebrand tipo 2; variantes genéticas; exones; genotipo; fenotipo; Colombia.

## Abstract

**Introduction** Von Willebrand's disease is the most common hereditary coagulopathy in the population, the approach of molecular analysis as diagnostic support has been little. EvW type 2. The aim of this study is to characterize variants in exon 28 of the VWF gene and to perform genotype-phenotype correlation in a sample of patients with type 2 VWD. **Methods:** 20 samples from patients previously diagnosed with VWD were analyzed. Von Willebrand disease type 2 with ages between 8 and 56 years. Analysis of Exon 28 of the VWF gene was performed, by amplification, verification by electrophoresis in agarose gels and sequencing with the Big Dye Terminator V3.1 Kit. **Results:** The pathogenic variant was identified in 15 (88.2%) unrelated patients. The p.Gly1609Arg variant was identified in 52.9% of the patients analyzed (n=9) alone or in combination, followed in frequency by p.Ile1425Phe (n=3), and p.Ala1437Thr (n=3) alone or in combination, 1 patient with p.Arg1597Trp and another with p.Arg1334Trp. Additionally, two pathogenic variants were identified in 31.6% (n=6) of patients (2 patients with p.Gly1609Arg/p.Ala1437Thr; 1 patient p.Gly1609Arg/p.Ser1506Leu; 1 patient p.Gly1609Arg/p.Arg1597Trp; 1 patient p.Gly1609Arg/p.Val1279Phe; and 1 patient p.Ile1628Thr/p.Ser1325Phe). No variant was identified in 2 patients (11.8%). It was possible to reclassify the EvW type 2 subtype in 40% (n=8) of patients. **Conclusions:** This is the first study performed in the country, which allowed the identification of the genetic cause of EvW for the first time in Colombia by sequencing specific exons in a follow-up cohort.

**Keywords:** Von Willebrand disease type 2; genetic variants; exons; genotype; phenotype; Colombia.

## Introducción

La enfermedad de Von Willebrand (EvW) es la coagulopatía hereditaria más común en la población y afecta sin distinción a ambos sexos. En esta enfermedad los pacientes presentan diferentes manifestaciones de sangrados debido a niveles bajos o disfunción del factor

von Willebrand (vWF).<sup>1,2</sup> Su prevalencia a nivel mundial se estima en 1 por cada 1.000 nacidos vivos, no obstante, este dato está en constante verificación derivado del subregistro y las barreras diagnósticas que se presentan en los laboratorios a nivel global.<sup>3,4</sup> Se han reportado otras incidencias de acuerdo con estimaciones multinacionales de la EvW procedentes de estudios transversales y entes mundiales, y de un

estudio transversal, la Encuesta Mundial Anual de 2023 de la Federación Mundial de Hemofilia, que arrojó una estimación de 1.5 por 100.000 basada en el número de pacientes.<sup>5</sup>

Esta condición se clasifica en tres tipos de acuerdo a la deficiencia presentada: cuantitativa (tipos 1 y 3) o cualitativa (tipo 2).<sup>6</sup> Las personas con EvW presentan sangrados mucocutáneos prolongados como epistaxis, sangrado de las encías, equimosis, sangrado en procedimientos dentales, menstruación excesiva, entre otros, los cuales pueden ser leves y moderados; pocas veces son severos según el defecto en el vWF o en los niveles de FVIII:C. En mujeres puede sospecharse en caso de sangrado menstrual excesivo, sangrados posparto y folículos hemorrágicos en el momento de la ovulación. La enfermedad también se caracteriza por la presencia de sangrados mayores como la hemartrosis, y hemorragias musculares o cerebrales en fenotipos severos (tipo 3).<sup>2,3</sup>

El diagnóstico clínico puede sospecharse utilizando el *Bleeding Assessment Tool (BAT)* y se confirma con pruebas de laboratorio específicas para la correcta clasificación de los subtipos 2 (2A, 2B, 2M y 2N), los cuales pueden presentar patrones similares entre sí se requiere de estudios moleculares y estudios fenotípicos adicionales, sin embargo, en algunos pacientes no puede ser conclusivo.<sup>7,8</sup>

Más de 700 variantes han sido relacionadas con la EvW en la base de datos de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH). Al realizar la búsqueda en otras bases como la *European Association for Hemophilia and Allied Disorders (EAHAD)* se encuentran alrededor de 1.000 variantes del gen VWF, entre las que se pueden encontrar variantes *missense*, *deleciones*, *duplicaciones*, *inserciones*, *nonsense* y *frameshift*.<sup>9</sup>

El gen VWF tiene una longitud de 178 Kb con 52 exones, este codifica para una proteína de 2813 aminoácidos con 15 dominios funcionales. El exón 28 es el más grande del gen con aproximadamente 1379 pb; en este exón la mayoría de variantes reportadas son para la EvW tipo 2, las demás variantes han sido reportados en los exones 17,18, y 20. La gran variabilidad en las condiciones fisiológicas inherentes a cada paciente (fases de la menstruación, ejercicio, inflamación o fiebre) dificultan la identificación y clasificación de los subtipos 2A, 2B, 2M y 2N.<sup>10,11</sup>

En la actualidad, existen varios métodos moleculares que permiten la identificación de las variantes presentes en el gen VWF, sin embargo, debido a su gran tamaño las tecnologías de mayor uso como la secuenciación de próxima generación (NGS) tiene un costo elevado (aproximadamente USD 795.00), por tal razón, se han propuesto diferentes estrategias para abordar el análisis del gen, como realizar la identificación de variantes de acuerdo con el subtipo de EvW. En el caso de la EvW tipo 2 no es necesario el análisis de toda la secuencia codificante, sino de los exones que codifican los dominios funcionales implicados en los distintos fenotipos, siendo los exones 17, 18, 20 y 28 los más estudiados y principalmente el exón 28 ya que la mayoría de las variantes patogénicas reportadas en las bases de datos se encuentran distribuidas a lo largo de este exón.<sup>12-14</sup> En el año 2021 las guías diagnósticas para la EvW recomiendan el uso de pruebas genéticas para discernir entre los subtipos de la EvW tipo 2, diferenciar el tipo 2N de una hemofilia A o descartar la implicación de otros genes relacionados.<sup>15</sup>

La secuenciación Sanger de estos exones es una opción económica (aproximadamente USD 245) y sencilla para identificar las variantes. En el presente estudio se empleó una metodología basada en amplificación por PCR seguida de secuenciación mediante *Big Dye terminators* en

el exón 28, para la identificación de variantes en una muestra de pacientes con EvW tipo 2; esto con el fin de realizar una correlación genotipo-fenotipo y así poder guiar el diagnóstico y brindar una asesoría genética adecuada a cada paciente. Adicionalmente se pretende comparar los hallazgos con estudios realizados a nivel mundial y analizar el comportamiento de este gen en una muestra de nuestra población.

## Materiales y métodos

### Estudio descriptivo transversal de cohorte

#### Pacientes

La muestra analizada corresponde a 20 pacientes con diagnóstico clínico y de laboratorio confirmado de enfermedad de Von Willebrand tipo 2, que asisten a la consulta de hematología de la Clínica Infantil Colsubsidio en la ciudad de Bogotá. Se trata de una muestra a conveniencia por la disponibilidad de los pacientes con el diagnóstico de enfermedad de Von Willebrand tipo 2.

Previo consentimiento se obtuvieron muestras de sangre periférica, se recolectaron 4 ml de sangre en tubo tapa lila con anticoagulante EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). En las historias clínicas fueron consultados datos de resultados de laboratorio para las pruebas de laboratorio vWF Ag UI/dL, vWF: Rco UI/dL, vWF: RCo/FvW Ag, FVIII UI/dL y determinación de multímeros.

El estudio fue aprobado por los comités de ética de la Clínica Infantil Colsubsidio (Número de aval: 306-1 2021) y de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia (Acta 012 B.FM.1.002-CE-0109-22). Todos los pacientes dieron su consentimiento informado de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

### Aislamiento de ADN y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizó el aislamiento de ADN a partir de 200µL de sangre periférica y se utilizó el kit QIAamp® DNA Mini and Blood Mini siguiendo las especificaciones del fabricante. Se realizó un PCR. El programa del termociclador: desnaturalización 95 °C por 5 min, 29 ciclos 95 °C por 30 seg, 60 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min y extensión 72 °C por 5 min. Los productos de la PCR se purificaron utilizando el PCR Purification kit de Invitrogen siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para la amplificación por PCR, se utilizaron los primers descritos Freitas *et al.*,<sup>16</sup> a los cuales se les realizaron algunas modificaciones para optimizar la amplificación por PCR. En los pacientes a quienes no se les encontró variantes en el exón 28, se realizó amplificación y secuenciación de los exones 18 y 20.

### Análisis de Secuencia

Se utilizaron entre 5-10 ng de fragmentos de PCR purificados para la secuenciación con el BigDye 3.1 terminator cycle sequencing kit. Los productos de reacción de secuencia se purificaron mediante el kit Xterminator de Applied Biosystems, previo a su análisis por electroforesis capilar en un equipo ABI 3500 con capilar de 50 cms y POP7. Para realizar el análisis de las secuencias e identificación de las variantes se utilizó el programas SeqScape V2.7 (applied Biosystems), comparando las secuencias con la secuencia de referencia: NG\_009072.2 (Homo sapiens von Willebrand factor (VWF), RefSeq-Gene (LRG\_587) on chromosome 12) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se realizó la descripción de las variantes genéticas encontradas y frecuencia en la muestra analizada y posteriormente se realizó la comparación de variantes encontradas con las bases de datos EAHAD, VARSOME, GNOMAD, y ClinVar, y con otros estudios. Las variantes se reportan siguiendo las guías de la Human Genome Variation Society (HGVS).<sup>17</sup> Los criterios de patogenicidad

de cada una de las variantes analizadas se llevó a cabo con base en las recomendaciones del ACMG.<sup>18</sup>

### Resultados

Se analizaron un total de 20 muestras de pacientes previamente diagnosticados con la enfermedad de Von Willebrand tipo 2, que asisten

a consulta en la Clínica Infantil Colsubsidio. La edad de los pacientes analizados oscila entre los 8 a los 56 años con una edad media de 24.15 años. De esta muestra el 60% es de sexo masculino y 40% femenino (Tabla 1). La mayoría de las pacientes presentan epistaxis (48%), siendo el sangrado menstrual abundante y sangrado gingival (16%) la segunda causa de consulta. El 40% de los pacientes cursan con más de un síntoma (Tabla 1 y 2).

**Tabla 1.**  
Características y sintomatología

Características	Valor
Media edad, en años	24.15 (8-56)
Sexo	
Mujeres	40% (n=8)
Hombres	60% (n=12)
Síntomas	
Epistaxis	48% (n=12)
Sangrados menstruales abundantes y sangrado gingival	16% (n= 4)
Equimosis	4% (n=1)
Sangrado en procedimiento ginecológico	4% (n=1)
Sangrado procedimiento quirúrgico	4% (n=1)
Hemartrosis	4% (n=1)
Sangrado digestivo	4% (n=1)

### Tipos de variantes

Por medio de Secuenciación Sanger se analizó el exón 28 en las 20 muestras recolectadas identificándose 41 variantes; 9 variantes (21.95 %)

fueron identificadas como causantes en 17 pacientes, todas de tipo *missense* (Tabla3). La gran mayoría de las variantes identificadas en este estudio se encuentran en los dominios A1 y A2 de la proteína (Figura 1).



**Tabla 2.**

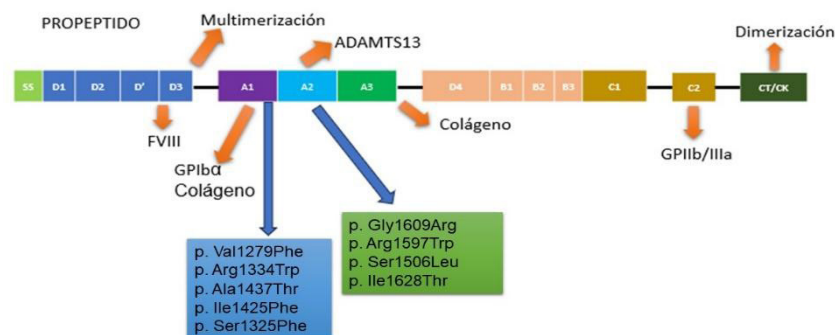
Datos demográficos y resultados de laboratorio de los pacientes

ID	Sexo	Edad	vWF Ag UI/ dL	vWF: Rco UI/ dL	vWF: RCo/FvW Ag	FVIII UI/dL	Multímeros <sup>1</sup>
P1	F	20	30	7.87	0.262	32	PHMWM
P2	M	11	74	29	0.392	101	Normales
P3	M	23	17	7.9	0.465	30	Normales
P4	F	36	13.8	5.9	0.428	22.7	NBI
P5	M	18	53	17	0.321	8.5	Sin dato
P6	M	19	29	0.1	0.003	49	PHMWM
P7	M	32	38	24	0.632	8	NBI
P8	F	14	88	21	0.239	118	Sin dato
P9	M	8	40	21	0.525	80	Presentes en cantidad reducida
P10	F	15	66	27	0.409	67	Sin dato
P11	M	8	43	23	0.535	91	Normales
P12	F	15	38	9.8	0.258	58	Normales
P13	F	9	30	14	0.467	53	PHMWM PIMWM
P14	M	15	59	20	0.339	84	Normales
P15	M	56	21	4.5	0.214	29	PHMWM
P16	M	44	25	0.2	0.008	28	PIMWM Y LMWM
P17	F	41	47	11	0.234	62	Normales
P18	F	21	79	26	0.329	106	Normales
P19	M	48	81	17	0.210	81	Normales
P20	M	30	20	3	0.150	17.5	PHMWM Y PIMWM

**Nota:** PHMWM= pérdida multímeros alto peso molecular; PIMWM= pérdida multímeros de intermedio peso molecular; PLMWM= pérdida multímeros bajo peso molecular; NBI= normales baja intensidad.

**Figura 1.**

Distribución de variantes en el exón 28 del gen VWF en la muestra analizada



Las variantes tipo *missense* fueron encontradas en 15 (88.24%) de los 17 pacientes analizados, todas distribuidas en los dominios A1 y A2 de la proteína. La variante p.Gly1609Arg (c.4825G>A) fue encontrada en 9 pacientes (52.94%). Cinco de esos pacientes (55.56%) tienen doble variante causal con un fenotipo diferente entre sí, dos con la variante p.Ala1437Thr (c.4309G>A), uno con la variante p.Ser1506Leu (c.4517C>T), uno con la variante p.Arg1597Trp (c.4789C>T) y uno con la variante p.Val1279Phe (c.3835G>T) (Tabla 3).

Se identificó una variante *missense* p.Ile1425Phe

(c.4273A>T) en tres pacientes (17.64%) de los 20 analizados; esta variante se encuentra ubicada en el dominio A1 de la proteína. El paciente P19 presenta doble variante causal p.Ile1628Thr (c.4883T>C) y p.Ser1325Phe (c.3974C>T).

En dos pacientes (Po8 y P20) en los cuales no se detectó variante patogénica o probablemente patogénica, se procedió a secuenciar los exones 18 y 20 del gen VWF como posibles sitios de ubicación de las variantes patogénicas, sin embargo, no se encontraron variantes asociadas al desarrollo de la enfermedad.

**Tabla 3**

Variantes patogénicas encontradas

ID	Variante genética	Sustitución de aminoácido	Tipo de variante	Reportada previamente
P01	c.4825G>A	p.Gly1609Arg	Missense	SI
P02	c.4825G>A	p.Gly1609Arg	Missense	SI
P03	c.4825G>A	p.Gly1609Arg	Missense	SI
P04	c.4825G>A	p.Gly1609Arg	Missense	SI
P05	c.4309G>A	p.Ala1437Thr	Missense	SI
	c.4825G>A	p.Gly1609Arg	Missense	SI
P06	c.4789C>T	p.Arg1597Trp	Missense	SI
P07	c.4273A>T	p.Ile1425Phe	Missense	SI
P08	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*
P09	c.4273A>T	p.Ile1425Phe	Missense	SI
P10	c.4000C>T	p.Arg1334Trp	Missense	SI
P11	c.4273A>T	p.Ile1425Phe	Missense	SI
P12	c.4273A>T	p.Ile1425Phe	Missense	SI
P13	c.4517C>T	p.Ser1506Leu	Missense	SI
	c.4825G>A	p.Gly1609Arg	Missense	SI
P14	c.4309G>A	p.Ala1437Thr	Missense	SI
	c.4825G>A	p.Gly1609Arg	Missense	SI
P15	c.4825G>A	p.Gly1609Arg	Missense	SI
P16	c.4789C>T	p.Arg1597Trp	Missense	SI
	c.4825G>A	p.Gly1609Arg	Missense	SI
P17	c.4825G>A	p.Gly1609Arg	Missense	SI
	c.3835G>T	p.Val1279Phe	Missense	SI
P18	c.4309G>A	p.Ala1437Thr	Missense	SI
P19	c.4883T>C	p.Ile1628Thr	Missense	SI
	c.3974C>T	p.Ser1325Phe	Missense	SI
P20	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*

**Nota:** N/A\*= no aplica, no se encontraron variantes.

De los 20 pacientes analizados, el 15 % presenta un fenotipo severo, con historial de transfusiones y profilaxis de factores (P06, P13 y P15) y uno de ellos presenta sangrados mayores a nivel gástrico y hemartrosis (P15).

El P05 (Tabla 2) presenta manifestaciones clínicas marcadas y asiste a la consulta por diagnóstico inicial de hemofilia A leve (tiene historia familiar de hemofilia A) y en el estudio ampliado de hemofilia A la dosificación del vWF:Rco le dio bajo en tres oportunidades diferentes; se

estudiaron los miembros de la familia para EvW y ninguno tiene niveles bajos, este paciente tiene un doble defecto de la coagulación: hemofilia A leve y EvW (tiene estudio genético también para hemofilia A).

Con las variantes encontradas y la correlación con los historiales clínicos se realizó una clasificación de los subtipos de EvW. Un total de 8 de 20 (40%) pacientes fueron reclasificados con base en los análisis moleculares realizados (Tabla 4).

**Tabla 4**

Clasificación tipo de EvW según estudios realizados

ID	Tipo de EvW 2 de acuerdo con estudios de laboratorio	Tipo de EvW de acuerdo con estudios genéticos
P01	2A	2A
P02	2M	2M
P03	2	2M
P04	2	2M
P05	2A	2A
P06	2A	2A
P07	2	2M
P08	2A	No identificado
P09	2A	2M
P10	2A	2M
P11	2A	2M
P12	2	2M
P13	2A	2A
P14	2	2M
P15	2A	2A
P16	2A	2A
P17	2M	2M
P18	2M	2M
P19	2M	2M
P20	2A	No identificado



## Discusión

Se analizó el exón 28 del gen VWF mediante secuenciación Sanger en 20 pacientes que asistían a consulta en la Clínica Infantil Colsubsidio. En este estudio se encontró variante patogénica causal en el 88.2% de los pacientes analizados; todas las variantes encontradas son de tipo *missense*, adicionalmente, en el momento de la asesoría genética complementaron los hallazgos con historia familiar y sintomatología.

En la muestra analizada se observa una variedad de manifestaciones clínicas que se presentan en distinto grado de severidad; los síntomas con mayor frecuencia fueron la epistaxis y sangrado menstrual (48% y 16%, respectivamente). En un estudio realizado 2017 que caracterizó mediante pruebas de laboratorio a 32 pacientes pediátricos con EvW de la ciudad de Bogotá, se reportaron como síntomas con mayor frecuencia la epistaxis y gingivorragia (64 % y 32 %), de igual forma en este estudio el porcentaje de pacientes con EvW tipo 2 fue superior a los otros tipos de EvW. Esta variabilidad clínica se debe a que la presentación de la EvW depende del grado de afectación que presente la proteína a nivel cuantitativo o cualitativo, del sexo de cada paciente y de las condiciones fisiológicas propias que difieren entre individuos.

Para la EvW tipo 2, la desmopresina tiene la capacidad de aumentar la liberación de niveles de vWF y FVIII en el torrente sanguíneo. Debido a la variabilidad en la capacidad de respuesta se recomienda evaluar individualmente antes de usarlo como un agente terapéutico. No obstante, en la bibliografía se han encontrado discrepancias en su uso para la EvW tipo 2 ya que las deficiencias son cualitativas. Sin embargo, se ha reportado eficacia de su uso en procedimientos menores. Para el subtipo 2B no es recomendado ya que favorece a la trombocitopenia.

Para la EvW tipo 2 en diferentes cohortes se han reportado variantes de este tipo, ubicadas principalmente a lo largo de los dominios funcionales de la proteína (Milán 88%, Brasil 84.2%, China 53.84 %, Argentina 37.5%, España 50.21 %, República Checa 50%).<sup>16,19-23</sup> La localización de las variantes en el gen VWF determina la función anómala del vWF y, por consiguiente, es una guía para identificar el subtipo de la EvW de tipo 2.<sup>24</sup>

### Variante p.Gly1609Arg

La variante p.Gly1609Arg fue encontrada en 9 pacientes (52.94%) (Tabla 3) y ha sido reportada en diferentes cohortes a nivel mundial, con múltiples individuos afectados con enfermedad de Von Willebrand tipo 2A.<sup>19,25</sup> En estudios de cohortes con mayor cantidad de pacientes en España, Francia, y en el Proyecto Zimmerman en Estados Unidos, las variantes con mayor frecuencia han sido Ile1628Thr, p.Ser1506Leu, y p.Arg1597Gln.<sup>21</sup> La variante p.Gly1609Arg está ubicada en el dominio A2 donde se encuentra el sitio de unión para la proteína ADAMTS13 (Figura 1). Los estudios funcionales de esta variante demuestran un efecto perjudicial que resulta en un aumento de la proteólisis de la proteína y en la mayoría de los casos pérdida de multímeros de alto e intermedio peso molecular.<sup>26</sup>

En la muestra analizada el 40% de los casos con esta variante presentan pérdida de los multímeros de alto peso molecular, 40% un patrón normal, 10% con un patrón normal pero de baja intensidad y en el 10% que no se tiene acceso al dato en su historia clínica, el patrón variable en los multímeros es causa del nivel de afectación que el vWF e influye la coexistencia con otras variantes.<sup>27</sup> De los nueve pacientes con la variante p.Gly1609Arg cinco de ellos tenían otra variante adicional (Tabla 3).

**Paciente P05:** el caso P05 cursa con doble defecto de la coagulación, hemofilia A confirmado en un estudio anterior donde se encontró

variante en hemicigosis en el gen F8 c.5666A>G p. Gln1889Arg, clasificada como variante de significado incierto (VUS) inicialmente, pero con niveles bajos de FVIII con severidad leve.<sup>28</sup> Esta variante ha sido posteriormente reclasificada a variante probablemente patogénica (ClinVar VCV001174594.1). En el presente estudio se encontraron en el exón 28 del gen VWF dos variantes adicionales c.4825G>A. p.Gly1609Arg y c.4309G>A. p.Ala1437Thr, las cuales han sido reportadas en pacientes con EvW 2M.<sup>29,30</sup> Este paciente tiene historia familiar: abuelo materno, madre, hermano, primos y tía materna con diagnóstico confirmado de hemofilia A leve, y fenotípicamente presenta disminución del factor VIII más marcada que sus otros familiares, tiene vWF:RCo disminuido (ningún miembro de la familia estudiado lo tiene) y el ratio vWF:RCo/FvW Ag es concordante con la EvW tipo 2A. No ha presentado manifestaciones clínicas severas. Las coagulopatías hereditarias que coexisten con la EvW son poco frecuentes siendo la hemofilia A la más común en estos casos. No se tiene una frecuencia definida para esta combinación ya que los casos reportados en la literatura son pocos y no han sido evaluados en grandes poblaciones.<sup>8,31-33</sup>

**Paciente P14:** el caso P14 presenta dos variantes; p.Gly1609Arg y p.Ala1437Thr, una clasificada como 2A y la otra como 2M. En diferentes estudios se ha reportado que una misma variante puede causar tanto el fenotipo del subtipo 2A como el fenotipo del subtipo 2M y es probable que en algunos casos se puedan presentar mayores dificultades al realizar la clasificación.<sup>34</sup> Este paciente presenta unas manifestaciones clínicas leves con un patrón de multímeros normales y de acuerdo su fenotipo y variantes presentadas es clasificado como un tipo 2M.<sup>35</sup>

**Paciente P13:** el caso P13 tiene la variante p.Ser1506Leu junto la variante p.Gly1609Arg, el cambio en la posición 1506 ha sido reportado previamente en estudios de la EvW tipo 2A.<sup>26,27,36-38</sup> Su efecto es la sustitución en

una posición conservada en mamíferos que afecta la estructura secundaria de la proteína debido a los cambios en polaridad, carga y tamaño de cada aminoácido y sus estudios funcionales muestran efecto en la producción de multímeros de alto e intermedio peso molecular y relacionada con actividad del vWF bastante alterada.<sup>26,27</sup> El paciente P13 presenta un cuadro clínico marcado y es uno de los pacientes que ha necesitado transfusiones a causa de sangrado excesivo y se encuentra bajo tratamiento profiláctico con factor FVIII rico en vWF. Diferentes casos se han reportado con la presencia de dos variantes en los que el cuadro del paciente varía de acuerdo con el nivel de disfuncionalidad del vWF, en este caso en particular las dos variantes se encuentran en el dominio funcional A2 (Figura 6). El patrón de multímeros del paciente muestra pérdida de los multímeros de alto e intermedio peso molecular; las dos variantes relacionadas juegan un papel importante en cuatro mecanismos que desregulados llevan a la aparición de la enfermedad: 1) retención intracelular y degradación de la proteína, 2) defectos en la multimerización, 3) desregulación almacenamiento y 4) aumento proteólisis mediada por el ADAMTS13.<sup>27</sup>

**Paciente P16:** la variante p.Arg1597Trp se encontró junto la variante p.Gly1609Arg en el paciente P16, paciente con un fenotipo severo, pérdida de multímeros de alto e intermedio peso molecular, con historial de transfusiones y con madre y hermano diagnosticados clínicamente con EvW tipo 3. La variante p.Arg1597Trp ha sido reportada en pacientes 2A, estudios *in vitro* han demostrado que esta aumenta la susceptibilidad al clivaje de la proteína mediada por el ADAMTS13, afectando los procesos de multimerización. Está reportada en varias bases de datos como patogénica y no ha sido reportada en las bases de datos de la población general, indicando que no es una variante común.<sup>39-41</sup> Adicionalmente la arginina en el codón 1597 es altamente conservada en el loop de unión al calcio del dominio A2 del vWF y otras

variantes en esa posición han sido reportadas como patogénicas en pacientes con EvW tipo 2A.<sup>20,42</sup> La variante p.Arg1597Trp se encontró también en la paciente P06, quien presenta un cuadro clínico moderado caracterizado por la presencia de sangrados nasales y menstruales abundantes, con historia familiar de padre, abuelo, hermano menor, tía y primos paternos con diagnóstico clínico de EvW; adicionalmente tiene tratamiento profiláctico con factores FVIII rico en vWF.

**Paciente 17:** el caso P17 tiene la p.Val1279Ile junto la variante p.Gly1609Arg, esta ha sido reportada en varios individuos afectados con la EvW, tipos 1, 2M, o 3.<sup>43-45</sup> La valina en el codón 1279 es moderadamente conservada, y los análisis computacionales en distintos estudios con programas como SIFT y PolyPhen-2 predican que esta variante es tolerada; sin embargo, debido a la falta de datos clínicos y funcionales su importancia clínica es incierta en este momento.<sup>24</sup> El paciente presenta un fenotipo leve quien asiste a consulta derivando a hijo diagnosticado clínicamente con EvW.

### Variante p.Ile1425Phe

Los pacientes P09, P11 y P12 tienen la variante p.Ile1425Phe, la cual ha sido reportada en la literatura en múltiples individuos con enfermedad de von Willebrand tipo 2M. Está ubicada en el dominio A1 sitio de unión para el GPIIb de las plaquetas; en los estudios funcionales reportados hasta el momento esta sustitución no genera mayor afectación en los procesos de multimerización y proteólisis de la proteína, sin embargo, existe una disminución en la afinidad entre el vWF y las plaquetas.<sup>19,46,47</sup> En estas muestras los pacientes P09 y P11 son hermanos, los dos con sangrado leve, inicialmente habían sido clasificados como tipo 2A, pero debido a la variante encontrada y el patrón de multímeros presentes en cantidad reducida y normales, respectivamente, se pueden reclasificar como tipo 2M. El paciente P12 con la variante

p.Ile1425Phe tiene un cuadro clínico leve con sangrados nasales de difícil control, un patrón de multímeros normal y sin antecedentes familiares relacionados. El estudio más reciente donde esta variante fue reportada es en una cohorte de pacientes españoles en un único paciente de 15 años con un cuadro clínico similar al P12, en ese estudio se realizaron análisis de predicción con cinco programas diferentes (PolyPhen, Sift, TASTERprediction Mut Asesor y Provean Prediction), los cinco con predicciones de ser variante deletérea para el funcionamiento de la proteína.

### Variante p.Arg1334Trp

El caso P10 tiene la variante p.Arg1334Trp reportada por primera vez en el año 2022 en una cohorte de 166 pacientes de la Republica Checa. Los pacientes a quienes se les detectó esta variante tenían un fenotipo leve que en un principio se determinó como EvW tipo 1, sin embargo, debido al patrón de multímeros presentado y a la ubicación de la variante en el sitio de unión al GPIIb se determinó como una variante para tipo 2M y, de igual forma, en los programas de predicción ha sido catalogada como patogénica.<sup>48</sup> El paciente P10 tiene un cuadro clínico leve epistaxis a repetición y patrón de multímeros no evaluado.

### Variante p.Ile1628Thr y p.Ser1325Phe

El caso P19 tiene dos variantes p.Ile1628Thr y p.Ser1325Phe, la primera variante está ubicada en el dominio A2 y se ha descrito en al menos cuatro estudios en los que se encuentra en al menos 28 individuos con diferentes subtipos de EvW. No se encuentra en el Proyecto 1000 Genomas o ExaAC, y los estudios funcionales demostraron que esta variante desestabiliza el estado de plegado de la proteína y disminuye su fuerza de tracción.<sup>38,49</sup> Por otra parte la variante p.Ser1325Phe está ubicada en el dominio A1 y ha sido reportada para pacientes tipo 2M; sus estudios funcionales han demostrado que

p.Ser1325 se encuentra en el sitio de unión del vWFA1 y el GPIb plaquetario, una sustitución en esta posición impide la formación del complejo con GPIb y la consecuente pérdida de unión del vWF al GPIb $\alpha$ .<sup>35,50</sup> El paciente P19 tiene un cuadro clínico de sangrados leves con un patrón de multímeros normales concordante con el subtipo 2M y presenta una historia familiar de hijos, papá y tía materna con sangrados nasales sin diagnósticos.

### Clasificación en subtipos EvW tipo 2

El 45% de los pacientes fueron clasificados con EvW Tipo 2M, 40% EvW tipo 2A, un 5% no tiene una clasificación clara 2A/2M debido a falta de pruebas de laboratorio como los multímeros que nos permitirían hacer una correlación concisa (ver Tablas 3 y 6). La EvW tipo 2A es el subtipo con mayor frecuencia a nivel mundial del tipo 2; sin embargo, varios estudios han demostrado que una variante puede estar relacionada con el subtipo 2A y con el subtipo 2M y que muchas veces derivado de la variabilidad clínica hay un subdiagnóstico de EvW tipo 2 M, que es superado si se tiene claridad en la correlación fenotipo-genotipo y los sitios de unión afectados. En este estudio la correlación de estas variantes con los resultados de las pruebas de laboratorio como el patrón de multímeros, nos permite hacer una correcta clasificación.<sup>10,35</sup>

### Análisis de pacientes sin variante en el Exón 28

No se encontraron variantes en dos pacientes (Po8 y P20) con este acercamiento de análisis por puntos *hotspot* como el exón 28. Es frecuente que en un bajo porcentaje no se detecten variantes relacionadas con el desarrollo de la enfermedad y según las recomendaciones del diagnóstico molecular el siguiente paso es analizar los otros exones funcionales.<sup>51</sup> Se realizó secuenciación de dos exones adicionales, el 18 y el 20 sin éxito en encontrar la variante causal, estos casos siguen en estudio con su clasificación inicial, con base en los estudios

de laboratorio. En comparación con la EvW tipo 1 y 3, la EvW 2 tipo en su diagnóstico molecular no necesita del estudio completo del gen VWF; es importante dar inicio con el análisis de los exones que codifican los dominios funcionales de la proteína siendo el *hotspot* principal el exón 28.<sup>16,51</sup>

La EvW subtipo 2N no se encontró en esta muestra, aunque no se descarta en los dos pacientes en los que no se encontró variante principalmente en el P20, ya que muestra una disminución del FVIII (Tabla 3). El *hotspot* para las variantes de este subtipo se encuentra en los exones 17 a 24, de los cuales solo dos fueron analizados en este estudio.<sup>9,52</sup>

## Conclusiones

Se realizó por primera vez un estudio molecular en Colombia en un grupo de pacientes con EvW tipo 2 de una cohorte de seguimiento, identificando en el 90 % de los pacientes la variante patogénica de la enfermedad, mediante la metodología implementada de amplificación y secuenciación directa del exón 28 del gen VWF y se logró clasificar y confirmar los subtipos de EvW tipo 2 de cada uno de los pacientes estudiados.

El exón 28 es un *hotspot* para las variantes de la EvW tipo 2; no obstante, se debe proceder al análisis de otros exones que codifiquen dominios funcionales cuando no se encuentren variantes en este exón. La variabilidad en los resultados de laboratorio y manifestaciones clínicas en los distintos subtipos dificulta la clasificación y el análisis genético puede ser una ayuda adicional cuando se tienen dudas en el subtipo.

Existen variantes que han sido reportadas para subtipos 2A y 2M, por lo cual basarse en los



resultados de las pruebas de laboratorio es de gran ayuda para discernir entre los dos subtipos.

En los dos pacientes en quienes no se encontraron variantes en los exones 28, 18 y 20, se debe ampliar el estudio a los demás exones funcionales o en su defecto descartar otra entidad por el análisis de otros genes como el ADAMTS13 y el GP1BA.

Este análisis molecular permitió determinar la causa de EvW en la muestra analizada, brindar el asesoramiento genético adecuado a cada familia con la entrega de resultados, compilar la historia familiar y revisar el abordaje diagnóstico desde la secuenciación de exones específicos.

#### Fuente de financiación

Este estudio fue desarrollado en Servicios Médicos Yunis Turbay y contó con el apoyo de la Clínica Infantil Colsubsidio de Bogotá. Agradecemos al personal de los centros y a los pacientes que participaron en el estudio por su relevante contribución.

#### Conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

#### Colaboraciones

Todos los autores colaboraron en la concepción y diseño del estudio, la adquisición y el análisis de los resultados, y en la escritura del manuscrito y su revisión crítica.

#### Biografía de autores

Laura Katherine Parada Ferro. Bacterióloga y Laboratorista Clínica, Magister en Genética Humana.

Adriana Linares Ballesteros. Especialista en Pedi-

atría, Oncohematología pediátrica y Bioética.

Claudia Patricia Casas Patarroyo. Médica Hematóloga.

Andrea Dadeiba Rodríguez Fiquitiva. Profesional en Enfermería.

Claudia Suárez Molano. Profesional en Enfermería.

Luz Karime Yunis Hazbun. Médica, MSc. en Genética.

Juan Jose Yunis Londoño. Médico, MSc. en Genética.

## Referencias

1. Hernández-Zamora E, Zavala-Hernández C, Quintana-González S, Reyes-Maldonado E. Enfermedad de von Willebrand, biología molecular y diagnóstico. *Cir Cir* [Internet]. 2015;83(3):255–64. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.circir.2015.05.010>
2. Woods AI, Blanco AN, Kempfer AC, Paiva J, Bermejo EI, Sánchez Luceros A, et al. Factor von Willebrand y Enfermedad de von Willebrand: nuevos enfoques diagnósticos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoam* [Internet]. 2016;50(2):273–89. Disponible en: [https://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-29572016000200012&lng=es](https://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572016000200012&lng=es)
3. James PD, Goodeve AC. von Willebrand disease. *Genet Med* [Internet]. 2011 [cited 2025 Jan 1];13(5):365–76. Disponible en: <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3182035931>
4. Ruggeri ZM, Zimmerman TS. von Willebrand Factor and von Willebrand Disease. *Blood* [Internet]. 1987 [cited 2025 Jan 1];70(4):895–904. Disponible en: <https://doi.org/10.1182/blood.V70.4.895.895>



5. World Federation of Hemophilia. World Federation of Hemophilia Report on the Annual Global Survey 2023 [Internet]. 2023. Disponible en: <https://www1.wfh.org/publications/files/pdf-2525.pdf>
6. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC, Favaloro EJ, Hill FG, Holmberg L, et al. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2006;4(10):2103–14. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.02146.x>
7. Fressinaud E, Mazurier C, Meyer D. Molecular genetics of type 2 von Willebrand disease. *Int J Hematol* [Internet]. 2002;75(1):9–18. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/bf02981973>
8. Connell NT, Flood VH, Brignardello-Petersen R, Abdul-Kadir R, Arapshian A, Couper S, et al. ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the management of von Willebrand disease. *Blood Adv* [Internet]. 2021;5(1):301–25. Disponible en: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003264>
9. Itzhar-Baikian N, Boisseau P, Joly B, Veyradier A. Updated overview on von Willebrand disease: focus on the interest of genotyping. *Expert Rev Hematol*. 2019;12(12):1023–36. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/17474086.2019.1670638>
10. Goodeve AC. The genetic basis of von Willebrand disease. *Blood Rev* [Internet]. 2010;24(3):123–34. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2010.03.003>
11. Goodeve A. Diagnosing von Willebrand disease: genetic analysis. *Hematology* [Internet]. 2016;2016(1):678–82. Disponible en: <https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.678>
12. Stufano F, Baronciani L, Peyvandi F. Diagnosis of von Willebrand Disease: Phenotypic Characterization. WFH eLearning Platf [Internet]. 2017; Disponible en: <https://elearning.wfh.org/resource/diagnosis-von-willebrand-disease-phenotypic-characterization/>
13. Favaloro EJ. Diagnosing von Willebrand disease: a short history of laboratory milestones and innovations, plus current status, challenges, and solutions. *Semin Thromb Hemost*. 2014;40(5):551–70. Disponible en: <https://doi.org/10.1055/s-0034-1383546>
14. Sharma R, Haberichter SL. New advances in the diagnosis of von Willebrand disease. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr*. 2019;(1):596–600. Disponible en: <https://doi.org/10.1182/hematology.2019000064>
15. James P, Connell NT, Ameer B, Di Paola J, Eikenboom J, Giraud N, et al. ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood Adv* [Internet]. 2021;5(1):280–300. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33570651https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7805340/>
16. Freitas SDS, Rezende SM, de Oliveira LC, Prezotti ANL, Renni MS, Corsini CA, et al. Genetic variants of VWF gene in type 2 von Willebrand disease. *Haemophilia*. 2019;25(2):e78–85. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/hae.13714>
17. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, et al. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat*. 2016 Jun;37(6):564–9. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/humu.22981>
18. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and

- Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* 2015 May;17(5):405–24. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
19. Borràs N, Batlle J, Pérez-Rodríguez A, López-Fernández MF, Rodríguez-Trillo Á, Lourés E, et al. Molecular and clinical profile of von Willebrand disease in Spain (PCM-EVW-ES): comprehensive genetic analysis by next-generation sequencing of 480 patients. *Haematologica.* 2017 Dec;102(12):2005–14. Disponible en: <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.168765>
20. Liang Q, Qin H, Ding Q, Xie X, Wu R, Wang H, et al. Molecular and clinical profile of VWD in a large cohort of Chinese population: application of next generation sequencing and CNVplex(®) technique. *Thromb Haemost.* 2017;117(8):1534–48. Disponible en: <https://doi.org/10.1160/th16-10-0794>
21. Seidizadeh O, Baronciani L, Pagliari MT, Cozzi G, Colpani P, Cairo A, et al. Phenotypic and genetic characterizations of the Milan cohort of von Willebrand disease type 2. *Blood Adv.* 2022 Jul;6(13):4031–40. Disponible en: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022007216>
22. Vangenechten I, Smejkal P, Zapletal O, Michiels JJ, Berneman Z, Zavrelova J, et al. Analysis of von Willebrand Disease in the South Moravian Population (Czech Republic): Results from the BRNO-VWD Study. *Thromb Haemost.* 2019 Apr;119(4):594–605. Disponible en: <https://doi.org/10.1055/s-0039-1678528>
23. Woods AI, Kempfer AC, Paiva J, Blanco AN, Sánchez-Luceros A, Lazzari MA. Diagnosis of von Willebrand disease in Argentina: a single institution experience. *Ann Blood; Vol 2, No 9 (December 2017) Ann blood [Internet].* 2017; Disponible en: <https://aob.amegroups.org/article/view/4207>
24. Maas DPMSM, Atiq F, Blijlevens NMA, Brons PPT, Krouwel S, Laros-van Gorkom BAP, et al. Von Willebrand disease type 2M: Correlation between genotype and phenotype. *J Thromb Haemost.* 2022 Feb;20(2):316–27. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/jth.15586>
25. Choi SJ, Lee EY, Kim HJ, Lee KA, Song J, Choi JR, et al. A Gly1609Arg missense mutation in the vWF gene in a Korean patient with von Willebrand disease type 2A. *Ann Clin Lab Sci.* 2012;42(1):98–102. Disponible en: <http://www.annclinlabsci.org/content/42/1/98.long>
26. Hassenpflug WA, Budde U, Obser T, Angerhaus D, Drewke E, Schneppenheim S, et al. Impact of mutations in the von Willebrand factor A2 domain on ADAMTS13-dependent proteolysis. *Blood [Internet].* 2006;107(6):2339–45. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120656798>
27. Jacobi PM, Gill JC, Flood VH, Jakab DA, Friedman KD, Haberichter SL. Intersection of mechanisms of type 2A VWD through defects in VWF multimerization, secretion, ADAMTS-13 susceptibility, and regulated storage. *Blood.* 2012 May;119(19):4543–53. Disponible en: <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-360875>
28. Yunis LK, Linares A, Cabrera E, Yunis JJ. Systematic molecular analysis of hemophilia A patients from Colombia. *Genet Mol Biol.* 2018;41(4):750–7. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0072>
29. Casaña P, Martínez F, Haya S, Tavares A, Aznar JA. New mutations in exon 28 of the von Willebrand factor gene detected in patients with different types of von Willebrand's disease. *Haematologica.* 2001 Apr;86(4):414–9. Disponible en: <https://haematologica.org/haematologica/article/view/1997>
30. Gadisseur A, van der Planken M, Schroyens W, Berneman Z, Michiels JJ. Dominant von

- Willebrand disease type 2M and 2U are variable expressions of one distinct disease entity caused by loss-of-function mutations in the A1 domain of the von Willebrand factor gene. *Acta Haematol.* 2009;121(2-3):145-53. Disponible en: <https://doi.org/10.1159/000214855>
31. Gastaldi G, Rasore-Quartino A, Galletti A, Campanella A, Barone E, Mannucci PM. Coexistence of haemophilia A and von Willebrand's disease in the same kindred. *Scand J Haematol.* 1978 May;20(5):423-8. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1978.tb02478.x>
  32. Kavakli K, BALKAN C, AKIN M, KARAPINAR DY, AY Y. Co-existing mild haemophilia A with mild type 1 von willebrand disease: Case report. *Uluslararası Hematol Derg [Internet]*. 2011;21(2):111-4. Disponible en: <https://doi.org/10.4999/uhod.10048>
  33. O'Brien SH, Ritchey AK, Ragni M V. Combined clotting factor deficiencies: experience at a single hemophilia treatment center. *Haemophilia.* 2007 Jan;13(1):26-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2006.01389.x>
  34. Favaloro EJ, Pasalic L, Curnow J. Type 2M and Type 2A von Willebrand Disease: Similar but Different. *Semin Thromb Hemost.* 2016;42(5):483-97. Disponible en: <https://doi.org/10.1055/s-0036-1579641>
  35. Favaloro EJ, Bonar RA, Mohammed S, Arbe-laez A, Niemann J, Freney R, et al. Type 2M von Willebrand disease - more often misidentified than correctly identified. *Haemophilia.* 2016 May;22(3):e145-55. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/hae.12903>
  36. Berber E, Pehlevan F, Akin M, Capan OY, Kavakli K, Çağlayan SH. A common VWF exon 28 haplotype in the Turkish population. *Clin Appl Thromb Off J Int Acad Clin Appl Thromb.* 2013 Sep;19(5):550-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1177/1076029612441054>
  37. Culpan D, Standen G, Wood N, Mazurier C, Gaucher C, Bidwell J. Rapid mutation screening in type 2A von Willebrand's disease using universal heteroduplex generators. *Br J Haematol.* 1997 Mar;96(3):464-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1997.d01-2054.x>
  38. Shen MC, Chen M, Ma GC, Chang SP, Lin CY, Lin BD, et al. De novo mutation and somatic mosaicism of gene mutation in type 2A, 2B and 2M VWD. *Thromb J.* 2016;14(Suppl 1):36. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12959-016-0092-2>
  39. Baronciani L, Federici AB, Cozzi G, Canciani MT, Mannucci PM. von Willebrand factor collagen binding assay in von Willebrand disease type 2A, 2B, and 2M. Vol. 4, *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.* England; 2006. p. 2088-90. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.02069.x>
  40. Pruss CM, Golder M, Bryant A, Hegadorn C, Haberichter S, Lillicrap D. Use of a mouse model to elucidate the phenotypic effects of the von Willebrand factor cleavage mutants, Y1605A/M1606A and R1597W. *J Thromb Haemost.* 2012 May;10(5):940-50. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04675.x>
  41. Starke RD, Paschalaki KE, Dyer CEF, Harrison-Lavoie KJ, Cutler JA, McKinnon TAJ, et al. Cellular and molecular basis of von Willebrand disease: studies on blood outgrowth endothelial cells. *Blood.* 2013 Apr;121(14):2773-84. Disponible en: <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-435727>
  42. Xu AJ, Springer TA. Mechanisms by which von Willebrand disease mutations destabilize the A2 domain. *J Biol Chem.* 2013 Mar;288(9):6317-24. Disponible en: <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.422618>
  43. Eikenboom JC, Castaman G, Vos HL, Bertina RM, Rodeghiero F. Characterization of the genetic defects in recessive type 1 and

- type 3 von Willebrand disease patients of Italian origin. *Thromb Haemost.* 1998 Apr;79(4):709–17. Disponible en: <https://doi.org/10.1055/s-0037-1615050>
44. Elayaperumal S, Fouzia NA, Biswas A, Nair SC, Viswabandya A, George B, et al. Type-3 von Willebrand disease in India-Clinical spectrum and molecular profile. *Haemophilia.* 2018 Nov;24(6):930–40. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/hae.13542>
  45. Veyradier A, Boisseau P, Fressinaud E, Caron C, Ternisien C, Giraud M, et al. A Laboratory Phenotype/Genotype Correlation of 1167 French Patients From 670 Families With von Willebrand Disease: A New Epidemiologic Picture. *Medicine (Baltimore).* 2016 Mar;95(11):e3038. Disponible en: <https://doi.org/10.1097/md.0000000000003038>
  46. Meyer D, Fressinaud E, Gaucher C, Lavergne JM, Hilbert L, Ribba AS, et al. Gene defects in 150 unrelated French cases with type 2 von Willebrand disease: from the patient to the gene. INSERM Network on Molecular Abnormalities in von Willebrand Disease. *Thromb Haemost.* 1997 Jul;78(1):451–6. Disponible en: <https://doi.org/10.1055/s-0038-1657568>
  47. Tischer A, Madde P, Moon-Tasson L, Auton M. Misfolding of vWF to pathologically disordered conformations impacts the severity of von Willebrand disease. *Biophys J.* 2014 Sep;107(5):1185–95. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.07.026>
  48. Vangenechten I, Smejkal P, Zavrelova J, Zapletal O, Wild A, Michiels JJ, et al. Analysis of von Willebrand Disease in the “Heart of Europe”. *TH open companion J to Thromb Haemost.* 2022 Oct;6(4):e335–46. Disponible en: <https://doi.org/10.1055/s-0042-1757635>
  49. Fidalgo T, Salvado R, Corrales I, Pinto SC, Borràs N, Oliveira A, et al. Genotype-phenotype correlation in a cohort of Portuguese patients comprising the entire spectrum of VWD types: impact of NGS. *Thromb Haemost.* 2016 Jul;116(1):17–31. Disponible en: <https://doi.org/10.1160/th15-07-0604>
  50. Arbelaez A, Niemann J, Freney R, Othman M, Emsley J, Mohammed S, et al. “Bleeding in the jungle”. *Am J Hematol.* 2015 Sep;90(9):843–6. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/ajh.24032>
  51. Baronciani L, Goodeve A, Peyvandi F. Molecular diagnosis of von Willebrand disease. *Haemophilia* [Internet]. 2017;23(2):188–97. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/hae.13175>
  52. Seidizadeh O, Peyvandi F, Mannucci PM. Von Willebrand disease type 2N: An update. *J Thromb Haemost.* 2021 Apr;19(4):909–16. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/jth.15247>