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

Diana Carolina Polanía Villanueva¹, Diana María Narváez Noguera²,
Helena Groot de Restrepo³

RESUMEN

El Factor von Willebrand circula en el plasma formando un complejo con el Factor VIII de coagulación por enlaces no covalentes. Esta interacción evita la degradación enzimática del Factor VIII y asegura su transporte al lugar de formación del coágulo de fibrina. Debido a su estrecha relación, la disminución de la actividad de un factor puede afectar la actividad del otro, lo que genera un diagnóstico clínico equivocado en cuanto a qué enfermedad se padece, si Hemofilia A o Enfermedad de von Willebrand. Este estudio reporta el caso de una familia colombiana que según diagnóstico clínico de su fenotipo, padecía las dos enfermedades. Sin embargo, dicha familia carecía de un estudio genético que permitiera verificar y contrastar el diagnóstico que hacen las entidades de salud. Por tal razón, se realizó un diagnóstico genético por pruebas moleculares que detectan mutaciones, como las inversiones en los intrones 1 y 22 por PCR de fragmentos largos y la secuenciación del gen del Factor VIII, esta última no aplicada y publicada en Colombia hasta el momento. Se encontraron dos mutaciones sinónimas en los exones 14 y 26 que no alteran la secuencia de aminoácidos en la proteína; por tanto, se descarta la presencia de Hemofilia A en la familia. Se plantea la posibilidad de un caso de Enfermedad de von Willebrand únicamente. El estudio demuestra la necesidad que hay en el país de ampliar las pruebas clínicas y de incluir el diagnóstico genético en casos de ambigüedad en el diagnóstico de estas coagulopatías.

Palabras clave: Hemofilia A, Factor VIII, Enfermedad de von Willebrand.

¹ Biol., MSc. Estudiante de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Los Andes, Bogotá.

² Biol., MSc. Estudiante de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Los Andes, Bogotá

³ Microbiol., MSc. Profesora Titular Facultad de Ciencias, Departamento de Ciencias Biológicas. Directora del Laboratorio de Genética Humana, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

MOLECULAR ANALYSIS OF HEMOPHILIA A IN A COLOMBIAN FAMILY WITH DIAGNOSIS OF HEMOPHILIA A AND VON WILLEBRAND DISEASE

ABSTRACT

Von Willebrand Factor circulates in plasma in a protein complex together with coagulation Factor VIII, joined by noncovalent bonds. This interaction prevents enzymatic degradation of Factor VIII and ensures its transport to the place of the fibrin clot formation. Because of their close relationship, decrease activity of one factor may affect the other one. The late generates a clinical diagnosis not very accurate for Hemophilia A or von Willebrand disease. We report here a Colombian family that apparently suffered the two diseases according to clinical diagnosis. However, the lack of a genetic study to verify and contrast the diagnosis made by health institutions, which is based on phenotype, only, can lead to a wrong classification of von Willebrand disease as a type of mild Hemophilia. The aim of this study was to confirm the clinical diagnosis in this family by molecular analysis. To achieve this, we identify the presence of Factor VIII gene inversions in introns 22 and 1 by LD - PCR and a general scan of the gene for frame shift mutations or stop codons through three family generations. Two synonymous mutations were found in exons 14 and 26, so no changes were observed in the aminoacid sequences, fact that disregards the presence of Hemophilia A. This family could be a case of von Willebrand disease only. The use of molecular techniques to confirm the clinical diagnosis for bleeding disorders will improve adequate treatment and patient prognosis in Colombia.

Key words: Hemophilia A, Factor VIII, von Willebrand disease.

INTRODUCCIÓN

La Hemofilia A es un trastorno genético recesivo ligado al sexo, que da como resultado una deficiencia en la actividad coagulante del Factor VIII del plasma, siendo la frecuencia de incidencia de 1:5,000 y 1:10,000 varones nacidos vivos dependiendo de la población (1-3). La Enfermedad de von Willebrand; por su parte, es un trastorno hereditario autosómico en el que hay deficiencia o disfunción del Factor von Willebrand. La Enfermedad de von Willebrand afecta alrededor del 1% de la población mundial y se considera el trastorno de coagulación menos severo (4, 5).

El gen del Factor VIII se ubica en el brazo largo del cromosoma X. Comprende 186 kb, 26 exones y 25 intrones, algunos de ellos muy grandes como el intrón 22 (16424 pb). Este gen tiene dos copias intragénicas (Factor VIIIA y Factor VIIIB) dentro del intrón 22 y dos copias extragénicas en la región telomérica que son altamente homólogas con las intragénicas (1). El gen del Factor von Willebrand se ubica en el brazo corto del cromosoma 12 en la posición p13.3, abarca 178 kb y constituye 52 exones cuyo tamaño oscila entre 1.3kb (exón 28) y 40 pb (exón 50) (6).

Tanto el Factor von Willebrand como el Factor VIII juegan un papel importante en la hemostasia para

formar un retículo de fibras de fibrina estable en los coágulos de sangre (7). El Factor von Willebrand circula en el plasma, estabiliza y forma un complejo con el Factor VIII por enlaces no covalentes (8). Esta interacción evita la degradación enzimática del Factor VIII y asegura su transporte al lugar de la formación del coágulo de fibrina, en donde promueve la adhesión y agregación plaquetaria al subendotelio. Allí el Factor VIII es activado a Factor VIIIa y actúa como cofactor para el Factor IX activado, el cual promueve un paso más en la cascada de coagulación sanguínea hasta formar el coágulo.

En el último reporte de la Federación Mundial de la Hemofilia se identificaron 400.000 personas que viven con desórdenes de coagulación en 108 países (5). En Colombia se calculan aproximadamente unos 2.800 pacientes. En el 2008, por ejemplo, se reportaron en el país, 1.658 pacientes con Hemofilia, 1.255 con Hemofilia A, 272 con Hemofilia B y 131 con Hemofilias de tipo desconocido. Sólo 1.446 hemofílicos están registrados en la Liga Colombiana de Hemofilia, incluyendo 54 con desarrollo de inhibidores, 303 casos de Hemofilia B y 208 casos de Enfermedad de von Willebrand (9).

La Enfermedad de von Willebrand en particular, es una anomalía tanto en la cantidad como en la estructura del Factor von Willebrand y se traduce en una alteración de la función plaquetaria en lo que respecta a su adhesión para formar el tapón blando o trombo blanco. Aunque el Factor von Willebrand actúa como transportador y estabilizador del Factor VIII, su principal función es participar en la función plaquetaria, concretamente en la adhesión de las plaquetas a las fibras de colágeno que quedan al descubierto tras una herida o daño endotelial, hecho que inicia una cascada de interacciones entre las plaquetas, el Factor von Willebrand y las glucoproteínas Ib/IX y IIb/IIIa, hasta unirse al fibrinógeno, para mediar la agregación plaquetaria irreversible

(Anexo 1). En la actualidad, la clasificación de la Enfermedad de von Willebrand se realiza con base en la concentración plasmática del Factor von Willebrand, a la actividad biológica y a los patrones de los multímeros. Factores como el sistema eritrocitario ABO del individuo pueden influir en la presentación y patología de la Enfermedad de von Willebrand. Aquellos individuos con grupo sanguíneo O tienen un nivel medio menor al de personas con otros grupos sanguíneos. A menos que el antígeno del Factor von Willebrand específico del grupo ABO referencie rangos habituales, los individuos del grupo O pueden ser diagnosticados erróneamente con Enfermedad de von Willebrand tipo 1. Algunas personas de grupo sanguíneo AB con un defecto genético del Factor von Willebrand pueden pasar por alto el diagnóstico porque los niveles son elevados debido a su grupo sanguíneo (10).

Cabe resaltar que desde el punto de vista del diagnóstico clínico las dos enfermedades son difícilmente distinguibles, pues las dos proteínas (Factor VIII y Factor von Willebrand) circulan juntas en la sangre y la disminución en la cantidad del Factor VIII también puede significar una disminución del Factor von Willebrand (11, 12). Tanto la Enfermedad de von Willebrand como la Hemofilia A presentan heterogeneidad alélica y expresividad variable (13). La expresividad variable, por ejemplo, es analizada dependiendo de la cantidad de Factor VIII o Factor von Willebrand en la sangre. Resultados del nivel de los Factores menores al 1% se clasifican como graves o severos, entre 1 a 5% moderados y entre 5 a 49% leves para Factor VIII. En el caso del Factor von Willebrand, entre 5 y 60% son considerados casos leves para grupos sanguíneos A, B y AB; y entre 5 – 40% casos leves para el grupo sanguíneo O (14). Adicionalmente, las dos enfermedades se describen como hemorragias o hematomas frecuentes o esporádicos sin causa aparente o ante un traumatismo en las superficies mucosas de nariz y boca. En casos severos, las hemorragias ocurren

en las articulaciones mayores de las extremidades (rodillas, tobillos y codos) y, en menor grado, en caderas, hombros y músculos grandes (15). Con frecuencia, las mujeres con Enfermedad de von Willebrand presentan menorragia y abortos con hemorragias severas (2, 16). Esto como consecuencia de que dicha enfermedad puede afectar por igual a hombres y mujeres, a diferencia de la Hemofilia, que en la mayoría de los casos sólo es padecida por hombres.

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

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra de estudio

La investigación tuvo como muestra una familia colombiana de tres generaciones entre los 6 y 65 años con doble diagnóstico clínico (Figura 1), independientemente de su sexo, edad, posibles comorbilidades u otras características sociodemográficas. Se excluyeron aquellos parientes que no presentaran vínculo consanguíneo. Según diagnóstico clínico de las diferentes Entidades Promotoras de Salud, la familia presentaba: un niño con He-

mofilia A y Enfermedad de von Willebrand (Figura 1. Individuo III.1), (Anexo 2) una mujer que padece Enfermedad de von Willebrand (Figura 1. Individuo II.1) y una mujer portadora de Hemofilia A (Figura 1. Individuo II.2). Los otros dos integrantes de la familia no habían sido diagnosticados clínicamente. Los miembros de la familia que participaron en el proyecto firmaron un consentimiento informado en el que autorizaron la toma de muestras de sangre y el uso de su material genético en este estudio. El presente trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Los Andes, según Acta 211 de 2013.

Toma de muestras

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

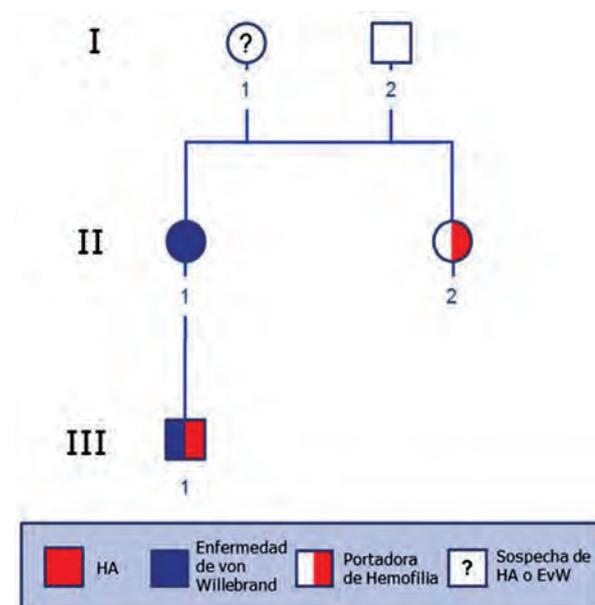


Figura 1. Genealogía de la familia objeto de estudio

Diagnóstico clínico de las dos enfermedades

Para corroborar el diagnóstico clínico previo, se hizo un segundo diagnóstico clínico a los cinco miembros de la familia, esta vez no por cada Entidad Promotora de Salud, sino en un solo Laboratorio de Referencia en Hemostasia para garantizar que todas las pruebas se hicieran con las mismas técnicas y tuvieran los mismos valores de referencia. Se solicitaron las mismas pruebas aprobadas por el Plan Obligatorio de Salud para estas coagulopatías: la actividad del FACTOR VIII (también llamada Antígeno plasmático del Factor VIII) y la actividad del Factor von Willebrand (también llamada actividad del coFactor ristocetina/del Factor von Willebrand FvW: RCo o FvW: Act) (17).

Extracción de ADN

Una vez recolectadas las muestras, se aislaron de ellas 350 µl de leucocitos y se hizo extracción de ADN por el método de *salting-out* (18) utilizando el kit de CorpoGen DNA2000. Se cuantificó la concentración de ADN mediante Nanodrop para la posterior amplificación.

Diagnóstico genético de Hemofilia A

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

Técnicas Moleculares para el diagnóstico genético de Hemofilia A

Inversiones de los intrones 1 y 22

La detección de las inversiones de los intrones 1 y 22 fue el primer paso en el filtro de mutaciones, pues en el caso de la inversión 22 se encuentra en el 40 a 50% de los pacientes con Hemofilia A severa (19). Para detectarlas fue necesario usar una variación de la PCR, el análisis llamado Long-Distance PCR, técnica basada en la Metodología de Liu et al. (20) y recientemente adaptada por Garcés-Gutiérrez (21). Así, se realizó la reacción con mezclas de parejas de primers de acuerdo con lo reportado por Polakova et al. (22). En la mezcla de PCR se usó el kit Platinum® PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen) con los siguientes componentes ya incorporados: *Taq* DNA polimerasa, polimerasa termoestable de la especie *Pyrococcus GB-D*, Anticuerpo Platinum® *Taq*; 66 mM Tris-SO₄ (pH 8.9); 19.8 mM (NH₄)₂SO₄; 2.4 mM MgSO₄; 220 µM dNTPs y estabilizadores. Las condiciones de temperatura para la LD-PCR fueron: una denaturación inicial de 94°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de denaturación a 94°C por 30 seg, alineamiento a 55°C por 30 seg y una extensión a 68°C por 13 min en cada ciclo. Los productos obtenidos se corrieron en un gel al 0,6% de agarosa a 80V por 3 horas.

Para la detección de la inversión del intrón 1 se usó el protocolo descrito por Bagnall et al. (23). Se usó la mezcla de primers 9cR, 9F e int1h-2F en la detección de la región int1h-1 y la mezcla int1h-2F, int1h-2R y 9F para la detección de la región int1h-2 y se compararon sus productos de amplificación (Anexo 4). Para la mezcla de reacción se utilizó del mismo modo el kit Platinum® PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen), pero en una PCR-multiplex en donde se colocaron al tiempo los cuatro primers antes mencionados (Anexo 3).

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

Secuenciación del gen del Factor VIII

La secuenciación se realizó amplificando los 26 exones con ayuda de los primers ya reportados en la base de datos <http://hadb.org.uk/WebPages/Database/Methods/keeneyprimers.doc>. (Anexo 5) y bajo las siguientes condiciones de PCR: 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 59°C por 45 segundos y 72°C por 90 segundos. La extensión final fue de 72°C por 5 minutos. Finalmente, se realizó una electroforesis para evaluar los tamaños esperados para cada exón en un gel al 2% de agarosa a 70V por 40 minutos. Posteriormente, se secuenciaron los productos de la PCR por el método de Sanger. Los resultados observados en los 26 exones del gen de la familia estudiada fueron confirmados tres veces. Se repitieron las secuenciaciones con el *Forward* y el *Reverse*.

Análisis de resultados

A través de la electroforesis y la posterior secuenciación, se observaron los fragmentos esperados para cada exón del Factor VIII. Con ayuda del programa CLC Main Workbench 7 se alinearon las secuencias de cada individuo con la secuencia consenso proporcionada por NCBI (24). Para conocer el posible efecto de dichas variaciones se utilizaron tres software, SIFT, PROVEAN y SNPeffector, que permitieron predecir si la sustitución de un aminoácido o un indel tiene algún impacto en la función biológica de la proteína del Factor VIII (25).

RESULTADOS

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

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

INDIVIDUO	Grupo sanguíneo eritrocitario ABO	Tiempo de Protrombina (TP)	Tiempo de Tromboplastina (TPT)	FvW	FVIII
I.1 Sin diagnóstico previo	A*	14.1 s.	30 s.	91.3-157.9	90 - 150
		10.4 s.	28.7 s.	81.5	59.9
II.2 Sin diagnóstico previo	O*	14.1 s.	30 s.	81.1 - 125.9	90 - 150
		11 s.	30 s.	70.3	68.8
III.1 Mujer con EvW	O*	14.7 s.	30.1 s.	81.1 - 125.9	90 - 150
		13.4 s.	31.9 s.	40	57.4
II.2 Mujer portadora de HA	O*	14.1 s.	30.9 s.	81.1 - 125.9	90 - 150
		15.50 s.	31.9 s.	70.4	60.4
III.1 Niño con HA y EvW	O*	14.1 s.	30.9 s.	81.1 - 125.9	90 - 150
		15.2 s.	31.6 s.	37.8	65.1

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

La inversión 1, que ocurre por secuencias homólogas, de aproximadamente 1Kb (*Int1h*) opuestamente orientadas y situadas hacia el extremo 5' (*upstream*) en el intrón 1 y 200Kb del Factor VIII hacia el telómero Xq (26) (Anexo 4), no se presentó en ninguno de los miembros de la familia como se puede observar en la Figura 2 (banda de 1.0 Kb).

Por su parte, la inversión 22 resulta de un intercambio recíproco entre secuencias homólogas de 9,5 Kb (*int22h*), una ubicada dentro del intrón 22 del Factor VIII (*int22h-1*) y otras dos copias adicionales de *int22h* (*int22h-2 e int22h-3*), ubicadas en posición telomérica, aproximadamente, a 400Kb hacia el extremo 5' (*upstream*) del gen del Factor VIII (26) (Anexo 6). Para dicha inversión los cinco

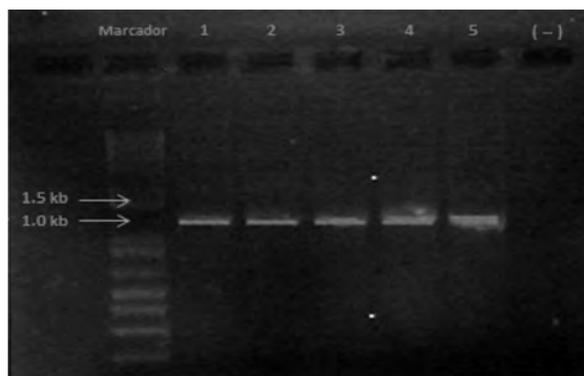


Figura 2. Detección de la inversión 1. Banda de 1.0 kb indica genotipo wildtype; es decir, que ningún miembro de la familia (muestras 1 a 5) presentan la inversión.

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

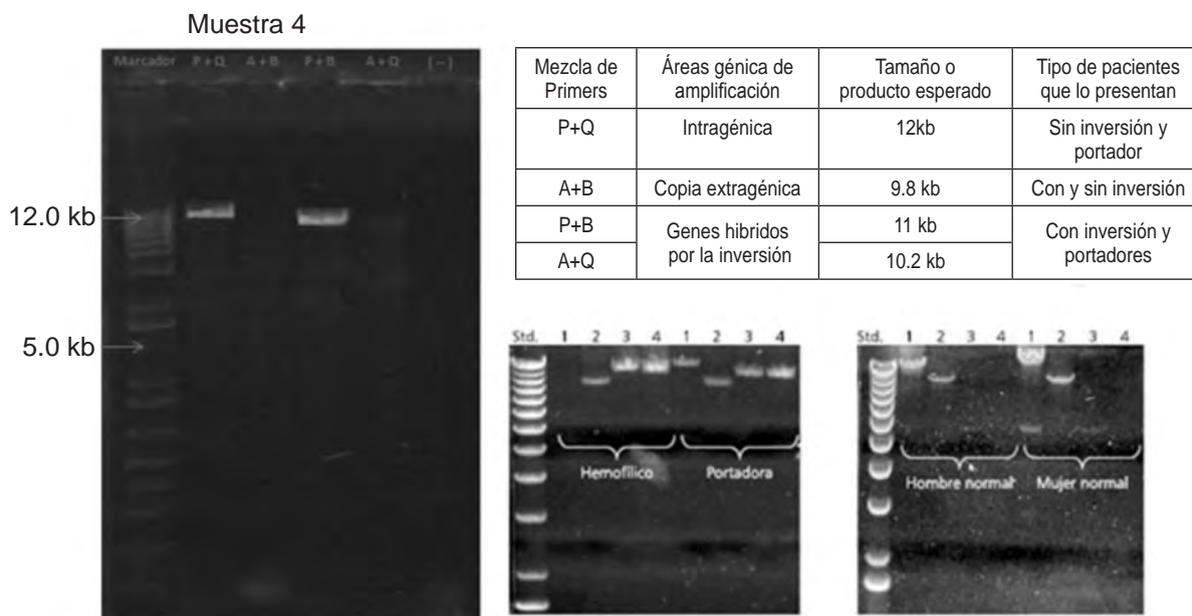


Figura 3. Detección de la inversión 22. A la izquierda resultado obtenido para la mujer II.1 con banda de 12 Kb para el carril con los primers P+Q y de 11 Kb para P+B. A la derecha arriba, resultado de bandas y tamaños esperados según la condición clínica. A la derecha abajo, gel de referencia de lo esperado. (19)

El nuevo resultado obtenido para la inversión 22 ratificó la necesidad de realizar la secuenciación general del gen del Factor VIII. Dicha secuenciación se logró hacer en los cinco miembros de la familia y se obtuvieron los tamaños de banda esperados para cada exón (Anexo 5). Los alineamientos realizados con el programa *CLC Main workbench 7* demostraron la presencia de solo dos variaciones en algunos miembros de la familia, rs1800292 y

rs1050705, ya reportadas en bases de datos como NCBI, Kaviar y HAMSTeRS.

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

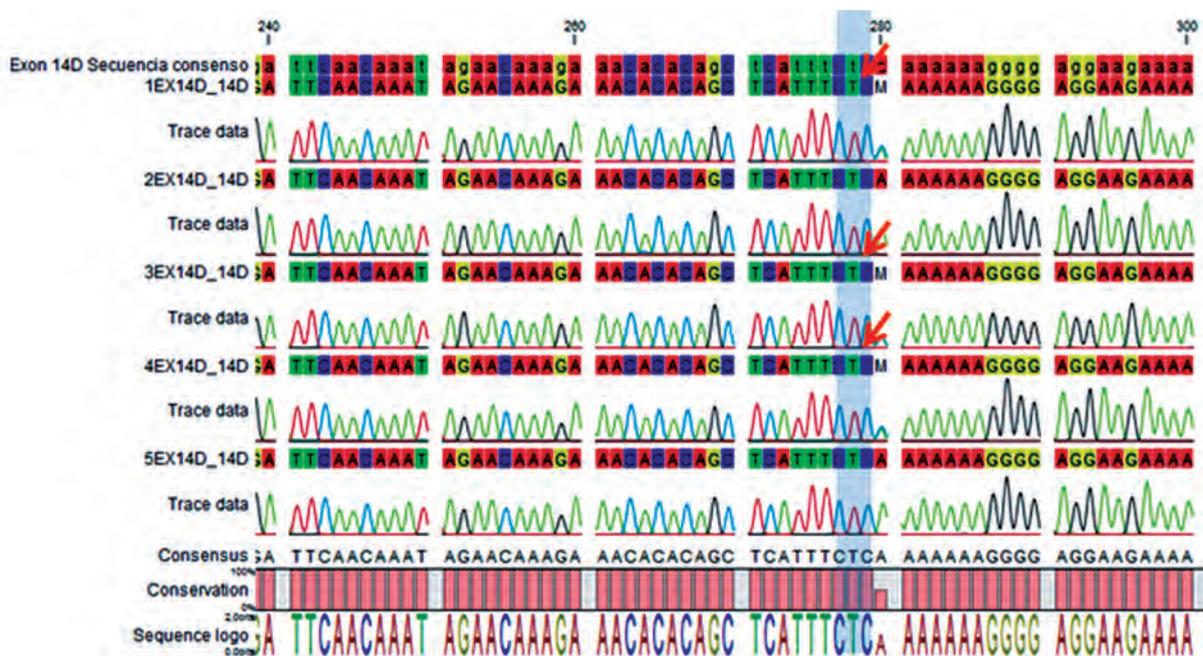


Figura 4. Polimorfismo en el exón 14 de tres miembros de la familia (individuos I.1: Secuencia 1EX14D, II.1: 4EX14D y II.2 3EX14D), cambio de una adenina por una citosina, variación tipo transversión, indicados con flechas naranjas diagonales.

De acuerdo con los resultados arrojados por SIFT y PROVEAN, así como en el reporte de NCBI la variación no afecta la proteína, pues es de tipo sinónima y en consecuencia se mantiene el aminoácido serina (NP_000123.1:p.Ser1288=). Lo anterior indica que pese a que los miembros de la familia I.1, II.1 y II.2 sean mujeres heterocigotas con un alelo A y el otro C, la proteína del Factor VIII sigue teniendo la misma secuencia. El efecto sobre

la proteína también se analizó en SNPeff 3.4 en donde se ratificó el efecto sinónimo de la variación.

La segunda variación reportada en las bases de datos fue detectada en el exón 26. Esta variación denominada rs1050705, constituye una Variación R en donde cambia una Guanina por una Adenina. En los individuos I.2 (2Ex26D) y III.1 (5Ex26D) se observó la transición de una guanina por una adenina

(sustitución de purina por purina). En los demás miembros de la familia se observa un polimorfismo con la presencia de los dos alelos, A y G (Figura 5). De esta variación NCBI, SIFT, PROVEAN y SNPeff 3.4 no cuentan con información respecto

a una predicción del efecto sobre la proteína del FVIII, de ahí que en esta investigación se dé por primera vez un reporte del efecto sobre la misma. El codón con el alelo de referencia original es CUA y codifica para el aminoácido Leucina.

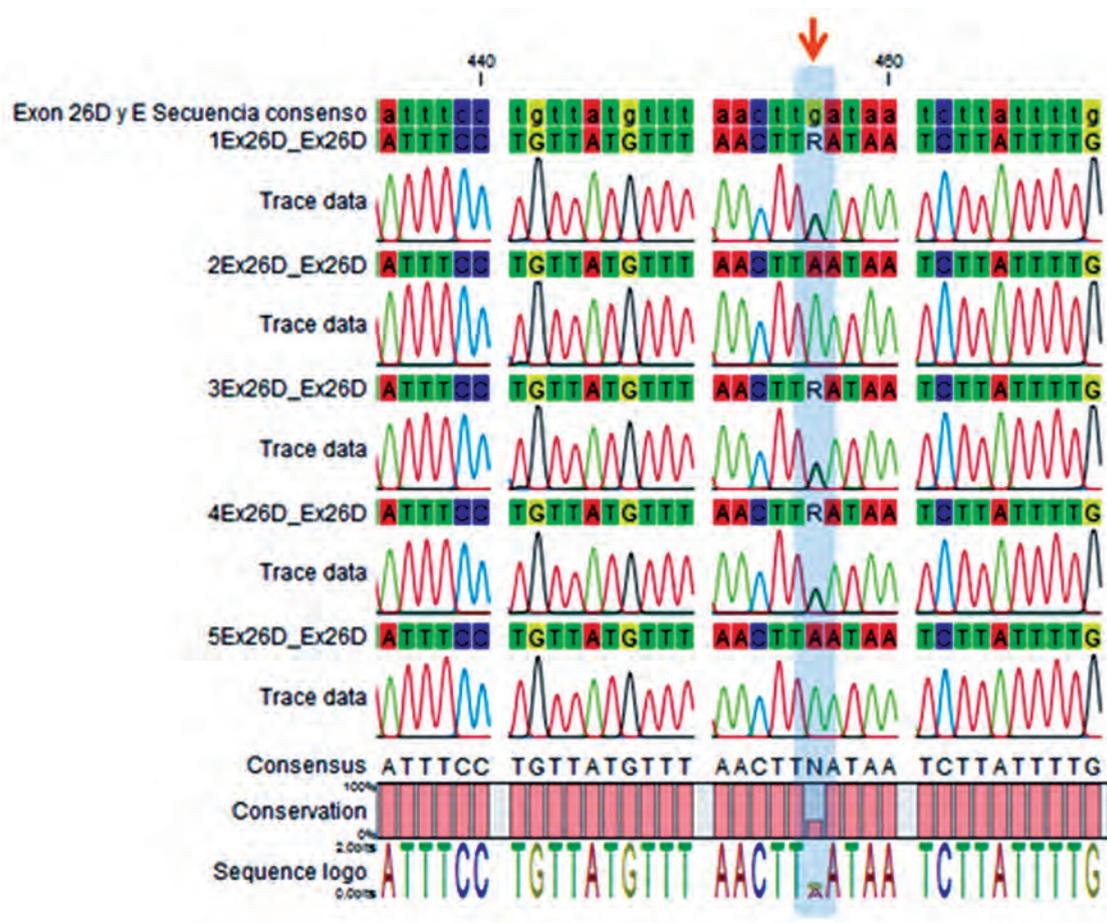


Figura 5. Polimorfismo en forma de heterocigoto en el exón 26 de los cinco miembros de la familia, variación de tipo Transición, cambio de una Guanina por una Adenina.

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

DISCUSIÓN

En condiciones normales, el complejo Factor tisular – Factor VIIa es el responsable inicial de convertir el Factor X en Factor Xa, el cual proporciona suficiente trombina para inducir la agregación local de las plaquetas y activación de los coFactores

Factor V y Factor VIII. Sin embargo, el Factor Xa es amortiguado por el inhibidor del Factor Tisular, lo que lo hace insuficiente para sostener la hemostasia. Solo la acción amplificadora del Factor IXa y Factor VIIIa sobre dicho Factor Xa permite que persista la misma (27). En el caso particular de las personas con Hemofilia A ó Enfermedad de von Willebrand, dichos mecanismos de coagulación sanguínea se ven alterados.

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

vitamino-K dependientes se incrementan durante la gestación, especialmente el Factor VII. También aumentan el Factor VIII, Factor von Willebrand y sobre todo el fibrinógeno (28).

El niño con el doble diagnóstico de Hemofilia A y enfermedad de von Willebrand (III.1), en sus primeras determinaciones de laboratorio presentó un nivel de Factor von Willebrand de 42,8 (valor de referencia de 60 - 150) y de Factor VIII de 45,7 (valor de referencia de 50 - 150). En el nuevo diagnóstico solo se encontró alterado el Factor von Willebrand con un nivel de 37,8. Si el Factor VIII está directamente implicado en la vía intrínseca de la coagulación y ésta es medida en el laboratorio con los TPT parcial activado (2, 29), era de esperarse que estos valores aparecieran un poco prolongados en los individuos II.2 y III.2; sin embargo, el leve aumento de dicho tiempo no es relevante pues se aceptan hasta 4 segundos prolongados por encima del valor de referencia. Cabe destacar que solo se consideran críticos valores de TP mayores de 20 segundos y de TPT mayores de 70 segundos (17), tiempos que no se dieron en la familia objeto de estudio. Los individuos I.1 y I.2 que previamente no habían sido analizados mostraron niveles normales de los dos factores, así como de TP y TPT.

El nuevo diagnóstico clínico basado en los resultados de laboratorio y en la apreciación de los hematólogos de las diferentes Entidades Promotoras de Salud de los individuos, mostró en la familia de estudio un caso más de Enfermedad de von Willebrand, en donde se desvirtúa el doble diagnóstico preliminar. Pero para descartar la presencia de Hemofilia A a nivel genético se buscó primero detectar las inversiones en los intrones 1 y 22. De acuerdo con los resultados la familia no presenta la Inversión 1, que ha sido reportada en el 5% de los pacientes con Hemofilia A severa (19). Esto es congruente con las manifestaciones clínicas en la familia, pues ninguno de sus miembros presenta

un fenotipo severo con hemorragias espontáneas en articulaciones y músculos.

Para el caso de la inversión 22, todos los individuos estudiados presentaron en las electroforesis banda en los carriles 1 y 3 que no permiten saber si se trata de personas hemofílicas, portadoras o sanas. Según Poggi, la inversión 22 es un producto de una recombinación homóloga entre la región intrónica y las regiones cercanas al telómero, lo que produce la traslocación de los exones 1 al 22 a la región cercana al telómero en forma invertida (19). Se cree que el gen distal, más telomérico, sería más inestable y proclive a la recombinación homóloga o que en las regiones adyacentes existirían secuencias que facilitarían el mecanismo de recombinación. Esto genera ausencia completa de expresión del Factor VIII y un fenotipo severo, que no es el caso de la familia estudiada. Es más, en los reportes existentes hasta el momento en la literatura no se evidencia ningún caso de inversión del intrón 22 en pacientes con fenotipo moderado o leve. Los pacientes con dicha inversión no pueden sintetizar un Factor VIII funcional dado que el gen está partido en dos y orientado en direcciones opuestas, por lo tanto es de esperar que todos los pacientes que presenten la inversión expresen un fenotipo grave (30).

Para identificar posibles variaciones en el resto del gen que tuvieran algún efecto en el fenotipo y confirmaran la presencia de Hemofilia A, se hizo secuenciación de los diferentes exones. El tipo de mutación que se puede encontrar con esta técnica permite predecir la severidad de la enfermedad, en especial en los casos esporádicos o sin antecedentes familiares que corresponden a cerca de un tercio de los pacientes. La secuenciación permite conocer también portadoras, una de las aplicaciones más importantes del análisis del gen del Factor VIII, a quienes se les podría brindar consejo genético por parte de personal especializado, o en quienes se

podría conocer la presencia de alelos con mutaciones en el gen del Factor VIII, así tengan niveles normales de actividad del Factor VIII y no sean detectadas dichas variaciones (19).

Los alineamientos realizados con CLC Main workbench 7 demostraron la presencia de sólo dos variaciones en algunos miembros de la familia, rs1800292 y rs1050705. Según los gráficos de población, el alelo ancestral adenina (A) de la variación rs1800292 podría provenir del noroccidente de Europa ($O=0,261$; $A=0,717$; $C=0,022$), y haber entrado con los eventos de colonización o migración a América. El cambio del codón AGU por AGC pudo haber aparecido inicialmente en población Emory; es decir, afroamericanos o caucásico-americanos donde la fijación del alelo C es total, pese a ser una transversión, mutaciones menos probables que las transiciones ($C=1,0$). La población que por esencia ha sido heterocigota, presentando los dos alelos es la GAIT, correspondiente a españoles caucásicos, lo que demostraría la posible ancestría de la familia por linaje materno con dicha población (Figura 6).

La variación rs1050705 en el exón 26, por su parte, es el resultado de un cambio de una Guanina por una Adenina (NG_011403.1:g.191799G>A). Extrapolando dicha información a los gráficos de población, se evidenció que sólo la población Emory; es decir, afroamericanos o caucásico-americanos poseen el alelo de referencia o ancestral G con una fijación igual 1,0. En las demás poblaciones el alelo alterno o mutado se encuentra más frecuentemente, incluso sin evidencia del alelo ancestral, lo que implicaría que dicha mutación no es rara, pues desde tiempo atrás, se ha fijado en las diferentes poblaciones, como en el caso de los Yorubas en Ibadan, Nigeria (YRI), europeos (ENSEMBL Venter y ENSEMBL Watson) y caucásicos (PGP), entre otras (Figura 7). Sólo la población GAIT, españoles caucásicos, presenta desde el inicio la condición heterocigota de A/G (0,488/0,512), tal como se

Sample Ascertainment				Genotype Detail						Alleles			
Population	Individual Group	Chrom. Sample Cnt.	Source	G/A	G/C	A/A	A/C	C	C/C	HWP	G	A	C
PGA-AFRICAN-PANEL	African American	48	IG	0.458	0.042	0.458	0.042			0.497	0.250	0.708	0.042
PGA-EUROPEAN-PANEL	European	46	IG	0.522		0.435	0.043			0.449	0.261	0.717	0.022
1ESP_Cohort_Populations						0.869	0.099		0.032	0.001		0.919	0.081
AGI ASP population						0.744	0.256			0.655		0.872	0.128
GAIT		16	IG			1.000						0.500	0.500
Cositi	Asian	13	IG			0.857	0.143					0.462	0.538
Emory		2	IG			1.000						1.000	
HSP_GENO_PANEL				0.220	0.068	0.407	0.254		0.051	0.819	0.144	0.644	0.212
YRI_GENO_PANEL				0.450	0.050	0.433	0.067			0.250	0.250	0.692	0.058
AAM_GENO_PANEL				0.048	0.016	0.774	0.161			0.549	0.032	0.879	0.089
CEU_GENO_PANEL				0.417	0.083	0.417	0.083			0.150	0.250	0.667	0.083
CHB_GENO_PANEL				0.444	0.044	0.400	0.111			0.368	0.244	0.678	0.078
JPT_GENO_PANEL				0.467	0.022	0.489	0.022			0.333	0.244	0.733	0.022

Figura 6. Frecuencia de los alelos de referencia y alterno en poblaciones reportadas en NCBI para la variación rs1800292. Se evidencia posible ancestría de la familia con población española caucásica

Sample Ascertainment				Genotype Detail						Alleles				
Population	Individual Group	Chrom. Sample Cnt.	Source	G/A	G/C	A	A/A	A/G	G	G/G	HWP	G	A	G
YRI		2	IG			1.000						1.000		
ENSEMBL_Variety						1.000						1.000		
ENSEMBL_Watson						1.000						1.000		
1PGP						1.000						1.000		
CEPH												0.810	0.190	
BUSMAN_POP2						1.000						1.000		
AFD_EUR_PANEL				0.391	0.174		0.304	0.130			0.273	0.283	0.565	0.152
AFD_AFR_PANEL				0.087	0.391		0.043	0.174		0.304	0.549	0.239	0.174	0.587
AFD_CHN_PANEL							0.609	0.217		0.174	0.050		0.717	0.283
TSC_42_AA												0.350	0.650	
TSC_42_C												0.850	0.150	
TSC_42_A												0.900	0.100	
PGA-AFRICAN-PANEL				0.125	0.375		0.042	0.167		0.292	0.549	0.250	0.188	0.562
PGA-EUROPEAN-PANEL				0.364	0.182		0.316	0.135		0.273	0.273	0.568	0.159	
GAIT		43	IG			0.956	0.045			0.005		0.488	0.512	
Cositi	Asian	14	IG			0.444	0.111	0.444	0.343			0.230	0.770	
Emory		7	IG			1.000						1.000		
HapMap-CEU				0.690	0.150		0.159	0.001				0.765	0.235	

Figura 7. Frecuencia de los alelos de referencia y alterno en poblaciones reportadas en NCBI para la variación rs1050705. Se evidencia nuevamente posible ancestría de la familia con población española caucásica.

observó en las mujeres de la familia (Figura 5, individuos I.1: Secuencia 1EX26D, II.1: 4EX26D y II.2 3EX26D), de ahí que la variación se vea en el alineamiento con el programa CLC Main workbench 7 como una variación R. Lo anterior es el resultado de la doble carga cromosómica del X en las mujeres, contrario a la única carga en los hombres que no permite observar heterocigotos, sino de una vez sustituciones cuando hay una variación. Esto se observó en los dos hombres de la familia objeto de estudio, en quienes es claro el cambio de Guanina por Adenina (Figura 5, individuos I.2: Secuencia 2EX26D y III.1: 5EX26D). Los datos de esta segunda variación evidencian nuevamente una posible ancestría de la familia con población española caucásica la cual sería interesante comprobar con análisis de marcadores informativos de ancestría.

De acuerdo con esta evidencia, podría suponerse que tanto el alelo de referencia como el mutado se encuentran fijados desde hace muchas generaciones en alguna parte de la población colombiana; por tanto, no se puede asegurar que la mutación tenga linaje materno o paterno en la familia objeto de estudio ni que haya mutaciones espontáneas en las células germinales de los parentales.

Los resultados del diagnóstico genético demostraron que la familia estudiada no presenta variaciones que afecten la proteína del Factor VIII; por tanto, se desvirtúa el doble diagnóstico clínico y la presencia de Hemofilia en ella desde un punto de vista netamente genético. La nueva genealogía de la familia propuesta a partir de este estudio (Figura 8), contempla solamente la Enfermedad de von Willebrand. Pese a que los nuevos resultados de laboratorio respecto a los niveles del Factor von Willebrand sólo mostraron alteración en los individuos II.1 y III.1 (madre e hijo), es muy probable que las mujeres I.1 y II.2 tengan también la enfermedad y por eso se proponen en el nuevo

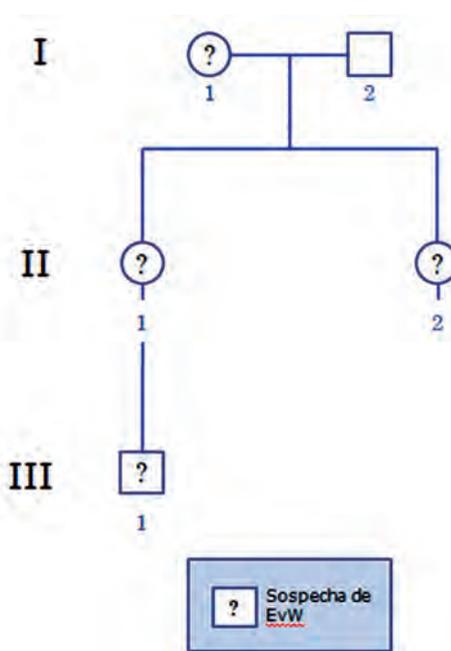


Figura 8. Nueva genealogía propuesta a partir del diagnóstico clínico, refutando la presencia de HA en la familia objeto de estudio.

diagnóstico como personas con sospecha, teniendo en cuenta la sintomatología que han presentado a lo largo de su vida.

Adicionalmente, es importante tener en cuenta que un factor ambiental que puede afectar los niveles del Factor von Willebrand y del Factor VIII es el estrés. Así, los niveles plasmáticos de dichos factores aumentan entre dos y cinco veces durante el estrés fisiológico o el ejercicio. Algunos autores consideran que las hormonas tiroideas, epinefrina, estrógeno y progesterona son todas sustancias que incrementan los niveles del Factor von Willebrand. También varían durante el ciclo menstrual, la toma de anticonceptivos orales y el embarazo, como se mencionó anteriormente (6). Dichos factores ambientales deben contemplarse como factores importantes en la detección de la Enfermedad de von Willebrand en toda la familia.

Como el problema de investigación planteaba la presencia de las dos enfermedades, se pensó en estudiar una de ellas con el propósito de comprobarla o descartarla a nivel molecular. La Enfermedad de von Willebrand no se analizó a nivel genético debido a que el gen del Factor von Willebrand es altamente polimórfico lo que complica su análisis genético (31) y muy extenso, con un tamaño de 178Kb y 52 exones (32). En la actualidad se carece de la suficiente información para lograr secuenciarlo, de ahí que se abordaran las dos enfermedades clínicamente, pero sólo la Hemofilia A a nivel genético.

Es importante resaltar que de acuerdo con los resultados de laboratorio iniciales que tenía la familia y tras varios años de contar con el doble diagnóstico, hay un claro problema de diagnóstico clínico de las dos coagulopatías estudiadas y de calidad en las prácticas médicas, pues no todos los laboratorios tienen en cuenta los mismos valores de referencia y aplican las mismas pruebas para identificar la presencia o no de cierta enfermedad. Incluso ciertas pruebas no están cobijadas en el régimen de salud y por tanto los médicos tienen que basar su diagnóstico en las permitidas. Con base en lo anterior, es probable que en estudios de laboratorio anteriores, los individuos II.2 y III.1 hayan sido diagnosticados con niveles de Factor VIII disminuidos cuando el factor que realmente estaba alterado era el Factor von Willebrand. De hecho, el gran problema que se presenta en esta familia es que los individuos no tienen los estudios completos que de verdad se requieren para descartar desde un punto de vista clínico las dos coagulopatías, como por ejemplo, el coFactor de Ristocetina, agregación plaquetaria, microscopía electrónica plaquetaria, Factor XIII, retracción del coágulo y el tiempo de trombina (17).

Se sabe de antemano que el Factor VIII se asocia con el Factor von Willebrand para que lo

estabilice al unirse al dominio B y al N- terminal del dominio A3 del Factor VIII. El Factor von Willebrand evita la unión de una superficie fosfolipídica al Factor VIII, superficie que la proteína C activada necesita para poder degradarlo (33). El Factor von Willebrand se encuentra tan estrechamente relacionado al Factor VIII que cuando se purifica éste último del plasma, se copurifica también el Factor von Willebrand y constituye casi el 95% del total de la proteína contenida. De hecho, el Factor VIII es un rastro en el plasma con una concentración de sólo 0.2 mg/L (34). Esto concordaría con la posibilidad de que la familia clínicamente hablando, posea Enfermedad de von Willebrand tipo 1 ó 2N, en la cual el Factor von Willebrand no se une al Factor VIII. Al no unirse, éste último no es estable y se degrada en el plasma por la proteína C activada. Al hacer el análisis del factor se asume que el Factor VIII no es funcional y se da el diagnóstico equivocado de Hemofilia A (35), situación que probablemente ocurrió con los individuos II.2 y III. Se asume que la familia objeto de estudio podría tener Enfermedad de von Willebrand tipo 1 o 2N porque en los dos tipos se consideran disminuciones de los niveles del Factor von Willebrand y Factor VIII; sin embargo, la tipo I que se hereda como un rasgo dominante, se diagnostica cuando son deficiencias cuantitativas parciales de los factores. La 2N o Normandía, un rasgo poco frecuente recesivo, es una deficiencia cualitativa que afecta la función de la proteína del Factor von Willebrand, situación muy cercana a la de algunos miembros de la familia (17). Se descarta la Enfermedad de von Willebrand tipo 3 en la familia pues ésta consiste en la ausencia virtual de la proteína del FvW y tiende a generar un fenotipo severo (6).

Saber específicamente si la familia presenta una Enfermedad de von Willebrand de tipo 1 o 2N depende de una serie de análisis de laboratorio más exhaustivos, que incluyan medidas cualitativas y cuantitativas del Factor von Willebrand y del

Factor VIII. Entre algunas pruebas especializadas para confirmar la Enfermedad de von Willebrand como las mencionadas anteriormente, estarían las pruebas de agregación plaquetaria con diferentes agentes agregantes como Ristocetina y colágeno. La prueba de actividad del CoFactor de Ristocetina en plasma puede determinarse a través de la aglutinación de una suspensión estandarizada de plaquetas en presencia del Factor von Willebrand utilizando el antibiótico ristocetina. La Enfermedad de von Willebrand está asociada a una reducción de la actividad del coFactor de la ristocetina y de forma generalizada se acepta que dicha prueba es el ensayo *in vitro* más útil para diagnosticar la Enfermedad de von Willebrand (36). Los análisis biológicos y clínicos deberán ir acompañados de un diagnóstico genético que permita comprobar mutaciones en el gen del Factor von Willebrand, lo que abriría la puerta a investigaciones futuras.

CONFLICTO DE INTERÉS

Las autoras manifestamos que no existe ningún conflicto de interés en la realización de este estudio.

FINANCIACIÓN

Cofinanciado por el Comité de Investigaciones y Posgrados de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes.

AGRADECIMIENTOS

A la familia objeto de estudio. A la Dra. Mónica Duarte, hematóloga de la Fundación Santa Fé de Bogotá, por sus aportes en el campo de la Hematología.

REFERENCIAS

1. Graw J, Brackmann H, Oldenburg J, Schneppenheim R, Spannagl M, Schwaab R. Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nat Rev Genet*. 2005; Jun;6(6):488-501.
2. Kasper C. Trastornos hereditarios de los Factores de coagulación plasmáticos y su manejo. Federación Mundial de la Hemofilia. (FMH). Tratamiento de la Hemofilia. 2008; Quinta Edición. No. 4. Abril.
3. Rick M, Walsh C, Key N. Congenital bleeding disorders. *Hematology*. ASH Education Book. 2003; January 1 vol. 2003 no. 1 559-574. doi: 10.1182
4. Lillicrap D. Ciencia básica, diagnóstico y tratamiento médico de la EvW. Federación Mundial de la Hemofilia. (FMH). 2008; Abril. No 35. Ontario, Canadá.
5. WFH. Report on the ANNUAL GLOBAL SURVEY. World Federation of Hemophilia. 2014.
6. Robertson J, Lillicrap D, James P. Enfermedad de Von Willebrand. *Pediatr Clin N Am*. 2008; 55; 377-392.
7. Martínez – Murillo C. Mecanismos de activación de la coagulación. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2006; 44 (Supl 2): 51-58
8. Devlin T. Bioquímica. Editorial Reverté. Cuarta Edición. Barcelona, España. 2006.
9. Colhemofílicos. Pasado, presente y futuro de la Hemofilia. Liga Colombiana de Hemofílicos y otras deficiencias sanguíneas. 2014.
10. Jiménez Moles E, Ortiza Callejón M, Béjar Pretel F. Enfermedad de von Willebrand y su diagnóstico en el laboratorio. Tomado de libroslaboratorio.wordpress.com. 2012.
11. Spronk H, Govers-Riemslog J, Cate H. The blood coagulation system as a molecular machine. *Bioessays*. 2003; 25: 1220-1228. DOI: 10.1002/bies.10360
12. Mannucci P. Hemophilia and related bleeding disorders: A story of dismay and success. *Hematology*. 2002; 1: 1-9. doi: 10.1182
13. Leiria L, Roisenberg I, Salzano F, Bandinelli E. Introns 1 and 22 inversions and Factor VIII inhibitors in patients with severe haemophilia A in southern Brazil. *Haemophilia*. 2009; Jan; 15(1):309-13.
14. Rodríguez – Martorell F, Mingo M, Palomo A, Nuñez R, Pérez – Garrido R, Villar A et al., Recomendaciones sobre Portadoras en Hemofilia. Real Fundación Victoria Eugenia y Federación Española de Hemofilia. 2009.
15. Gringeri A, Ewenstein B, Reiningger A. The burden of bleeding in haemophilia: is one bleed too many? *Haemophilia* 2014; 20: 459-63
16. Rhynders P, Sayers C, Presley R, Thierry J. Providing Young Women with Credible Health In-

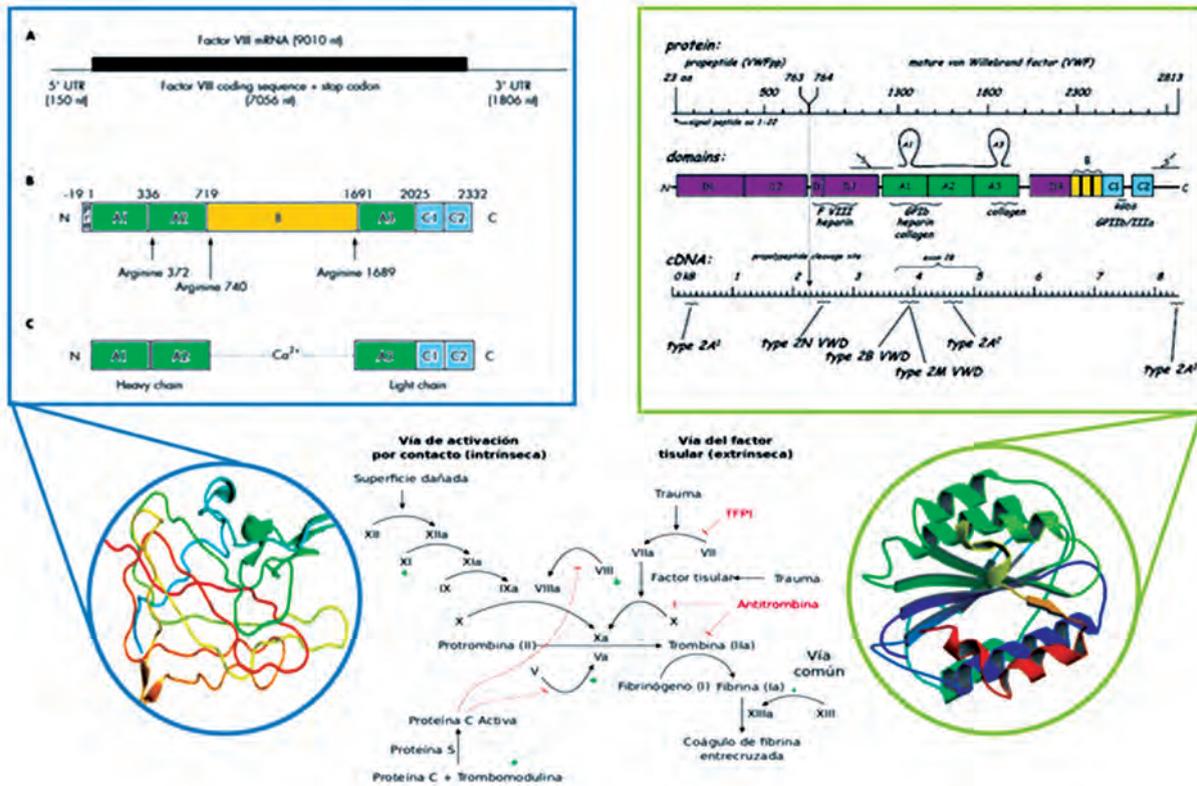
- formation about Bleeding Disorders. *Am J Prev Med*. 2014 Nov;47(5):674-80. doi: 10.1016/j.amepre.2014.07.040. Epub 2014 Sep 19.
17. Kitchen S, McCraw A, Echenagucia, M. Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación: Manual de laboratorio. Federación Mundial de Hemofilia. 2010; Segunda edición. Québec, CANADÁ
 18. Gaaib J, Nassief A, Al-Assi A. Simple salting – out method for genomic DNA extraction from whole Blood. *Tikrit J Pure Sci*. 2011; 16 (2). ISSN: 1813 – 1662.
 19. Poggi H, Honorato J, Romeo E, Zuñiga P, Quiroga T, Lagos M. Análisis de las inversiones del intrón 1 y 22 y secuenciación del gen F8 para el diagnóstico genético-molecular de hemofilia A en Chile. *Rev Med Chile*. 2011; 139: 189-196
 20. Liu Q, Nozari G, Sommer S. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A. *Blood*. 1998; Aug 15; 92(4):1458-9.
 21. Garcés-Gutiérrez, M. Estudio molecular de la inversión de los intrones 1 y 22 del FACTOR VIII de la coagulación en un grupo de pacientes pediátricos Colombianos con diagnóstico de HA. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia. 2012
 22. Poláková H, Zmetáková I, Kádasi L. Long distance PCR in detection of inversion mutations of F8C gene in hemophilia A patients. *Gen Physiol Biophys*. 2003; Jun; 22(2):243-53.
 23. Bagnall R, Waseem N, Green P, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the Factor III gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood*. 2002; Jan 1; 99(1):168-74.
 24. Bermeo S, Silva-Tamar C, Fonseca J, Restrepo C. Hemofilia: diagnóstico molecular y alternativas de tratamiento. *Colomb. Med*. 2007; v.38 n.3 Cali Jul. /Sep.
 25. Choi Y, Sims G, Murphy S, Miller J, Chan A. Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS ONE*. 2012; 7(10): e46688.
 26. Radic, C. Genética molecular de hemofilia: caracterización de mutaciones en hemofilia B, expresión de hemofilia en mujeres y desarrollo de nuevos métodos de análisis de inversiones. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina. 2010.
 27. García-Chávez J, Carrillo-Esper R, Majluf-Cruz A. Fisiología del sistema de coagulación. *Gac Méd Méx*. 2007; Vol. 143 Supl 1.
 28. Kadir R, James A. Salud reproductiva en mujeres con trastornos de la coagulación. World Federation of Hemophilia. Tratamiento de la hemofilia. 2009; octubre de 2009 no 48. Montréal, Québec, Canadá.
 29. Giangrande P. Hemofilia adquirida. World Federation of Hemophilia. Tratamiento de la hemofilia. 2005; Diciembre No. 38. Montréal, Québec, Canadá.
 30. Tizzano E. Las bases moleculares de la hemofilia A. En: Méndez Felpeto J. La genética molecular en el diagnóstico de las patologías humanas: estrategias y tecnologías. A Coruña: Universidad, p. 39-48. ISBN: 84-88301-48-0. 1996.
 31. Keeney S, Bowen D, Cumming A, Enayat S, Goodeve A, Hill M. The Molecular Analysis of von Willebrand Disease: a Guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organisation Haemophilia Genetics Laboratory Network. UK Haemophilia Centre Doctors' Organisation (UKHCDO). 2008.
 32. Goodeve A. Genotypic classification of von Willebrand disease. *Haematologica reports*. 2005; 1(4):16-19.
 33. Fay P, Coumans J, Walker F. Von Willebrand Factor mediates protection of Factor VIII from activated protein C- catalyzed inactivation. *J Biol Chem*. 1991; 266, 2172-2177
 34. Fulcher C, Zimmermann T. Characterization of the human Factor VIII procoagulant protein with a heterologous precipitating antibody. *Proc Natl Acad Sci*. 1982; 79, 1648-1652.
 35. Mazurier C, Dieval J, Jorieux S, Delobel J, Goude-mand M. A new von Willebrand Factor (vWF) defect in a patient with Factor VIII (FVIII) deficiency but with normal levels and multimeric patterns of both plasma and platelet vWF: Characterization of abnormal vWF/ FACTOR VIII interaction. *Blood*. 1990; 75, 20-26.
 36. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline - Fifth Edition. CLSI document. 2008; H21-A5 Vol. (28), No. (5).

Recibido: Octubre 10, 2014
Aceptado: Diciembre 2, 2014

Correspondencia:
Diana Polanía Villanueva
dc.polanía@uniandes.edu.co
Helena Groot
hgroot@uniandes.edu.co

Anexo 1

Estructura del FACTOR VIII y el FvW y su acción en la cascada de coagulación. Parte de ella tomada de <http://www.quimbiotec.com/Factor8.php> y http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/vwd/2_scientificoverview.htm



Anexo 2

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

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

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

Anexo 3

Detalle de la secuencia de los primers usados en la detección de las inversiones 1 y 22 del gen del FACTOR VIII de la coagulación.

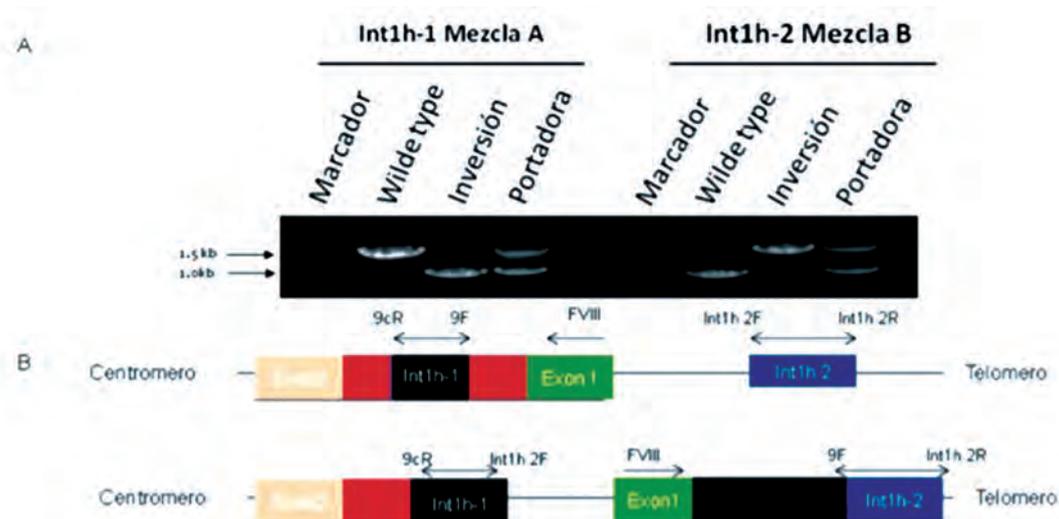
IDENTIFICACION	SECUENCIA
INT22 P	5'-GCCCTGCCTGTCCATTACACTGATGACATTATGCTGAC-3'
INT22 Q	5'-GGCCCTACAACCATTCTGCCTTTCACITTCAGTGAATA-3'
INT22 A	5'-CACAAAGGGGGAAGAGTGTGAGGGTGTGGGATAAGAA-3'
INT22 B	5'-CCCCAAACTATAACCAGCACCTTGAACCTCCCCTCTCATA-3'

PRIMERS INVERSION 1 FVIII

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

Anexo 4

Esquematación gráfica de la técnica LD PCR para la detección de la INV 1. A. Patrón de bandas en el gel de agarosa, según la mezcla de primers en cada caso. B. Representación gráfica de la técnica LD PCR en donde se muestra la ubicación del juego de primers en la detección y amplificación de las regiones int1h-1 e int1h-2. (21)



Anexo 5

Juego de primers para la secuenciación de los exones del gen del FVIII.
Tomada de <http://hadb.org.uk/WebPages/Database/Methods/keeneyprimers.doc>

Primer set	Primer sequences (N13 F & R standard tails are in italics)	Product size (bp) size inc. Tails
F8P2F F8P2R	gtagcgcgacggccagtGAGCTCACCATGGCTACATTC cagggcgcagcgcgatgacAATTTAAACTATAAAGCGAGTCCTG	561 595
F8P1F F8P1R	gtagcgcgacggccagtGGACCTAGGCCATGGTAAAGA cagggcgcagcgcgatgacTGCAGAGCATTTTAAGGAACTTT	600 634
F8EX1F F8EX1R	gtagcgcgacggccagtTAGCAGCCTCCCTTTTGCTA cagggcgcagcgcgatgacCTAACCCGATGTCTGCACCT	480 514
F8EX2F F8EX2R	gtagcgcgacggccagtCATTACTTCCAGCTGCTTTTTG cagggcgcagcgcgatgacTTTGGCAGCTGCACTTTTTA	290 333
F8EX3F F8EX3R	gtagcgcgacggccagtGCATGCTTCTCCACTGTGAC cagggcgcagcgcgatgacGCCACCATTACAAAGCACAC	299 324
F8EX4F F8EX4R	gtagcgcgacggccagtCATGTTTCTTTGAGTGACAGTGG cagggcgcagcgcgatgacTTCAGGTGAAGGAACACAAATG	372 406
F8EX5F F8EX5R	gtagcgcgacggccagtTCTCCTCCTAGTGACAATTTCC cagggcgcagcgcgatgacCCCATCTCCTTATTCTCTGA	259 293
F8EX6F F8EX6R	gtagcgcgacggccagtGCGGTCATTCATGAGACACA cagggcgcagcgcgatgacCCGAGCTGTTTGTGAACCTGA	258 292
F8EX7F F8EX7R	gtagcgcgacggccagtTGCTCCTAGCAAGTGTTCCTCATT cagggcgcagcgcgatgacAATGTCCCCTTCAGCAACAC	400 434
F8EX8F F8EX8R	gtagcgcgacggccagtCACCATGCTTCCCATATAGC cagggcgcagcgcgatgacATGGCTTCAGGATTTGTTGG	484 518
F8EX9F F8EX9R	gtagcgcgacggccagtTTTGAGCCTACCTAGAATTTTTCTTC cagggcgcagcgcgatgacGGTATTTAGAACTCAAACTCTCC	300 334
F8EX10F F8EX10R	gtagcgcgacggccagtTTCTTGTTGATCCTAGTCGTTTT cagggcgcagcgcgatgacGCTGGAGAAAGGACCAACATA	250 284
F8EX11F F8EX11R	gtagcgcgacggccagtCCCTTGCAACAACAACATGA cagggcgcagcgcgatgacTTCTTCAGGTTATAAGGGGACA	362 396
F8EX12F F8EX12R	gtagcgcgacggccagtTGCTAGCTCCTACCTGACAACA cagggcgcagcgcgatgacCATTCAATATCTGGACATCACTTTG	298 332
F8EX13F F8EX13R	gtagcgcgacggccagtCATGACAATCACAATCCAAAATA cagggcgcagcgcgatgacCATGTGAGCTAGTGGGCAA	364 398
F8EX14AF F8EX14AR	gtagcgcgacggccagtCTGGGAATGGGAGAGAACCT cagggcgcagcgcgatgacATGTCCCCTGTGATGGAG	567 601
F8EX14BF F8EX14BR	gtagcgcgacggccagtGATCCATCACCTGGAGCAAT cagggcgcagcgcgatgacGGCCATCAATGTGAGTCTT	599 633

F8EX14CF F8EX14CR	gtagcgcgacggccagtAGCTCATGGACCTGCTTTGT cagggcgcagcgcgatgacCATTCTCTGGATTAATGTTTCCTT	695 729
F8EX14DF F8EX14DR	gtagcgcgacggccagtTCCAAGCAGCAGAAACCTATT cagggcgcagcgcgatgacAGTAATGGCCCCTTTCTCCT	595 624
F8EX14EF F8EX14ER	gtagcgcgacggccagtGGATGACACCTCAACCCAGT cagggcgcagcgcgatgacCCTTCCACGAGATCCAGATG	570 604
F8EX14FF F8EX14FR	gtagcgcgacggccagtTCCCTACGGAACTAGCAATG cagggcgcagcgcgatgacTCAACAAGAGCAGAGCAAAGG	686 720
F8EX15F F8EX15R	gtagcgcgacggccagtTGAGGCATTTCTACCCACTTG cagggcgcagcgcgatgacCCAAAAGTGGGAATACATTATAGTCA	299 333
F8EX16F F8EX16R	gtagcgcgacggccagtCAGCATCCATCTTCTGTACCA cagggcgcagcgcgatgacAAAGCTTCTTATTGCACGTAGG	468 502
F8EX17F F8EX17R	gtagcgcgacggccagtcAGGTTGGACTGGCATAAAAA cagggcgcagcgcgatgacCCCTGGATCAAGTCTCATTG	397 431
F8EX18F F8EX18R	gtagcgcgacggccagtTGGTGGAGTGGAGAGAAAGAA cagggcgcagcgcgatgacAGCATGGAGCTTGTCTGCTT	362 396
F8EX19F F8EX19R	gtagcgcgacggccagtAACCAATGTATCTCATGCTCATTTT cagggcgcagcgcgatgacGGAAGAAAGCTGTAAAGAAGTAGGC	248 282
F8EX20F F8EX20R	gtagcgcgacggccagtTTTGAGAAGCTGAATTTTGTGC cagggcgcagcgcgatgacGAAGCATGGAGATGGATTCATTA	228 262
F8EX21F F8EX21R	gtagcgcgacggccagtCCACAGCTTAGATTAACCTTTCTCA cagggcgcagcgcgatgacTGAGCTTGCAAGAGGAATAAGTAA	261 295
F8EX22F F8EX22R	gtagcgcgacggccagtTCAGGAGGTAGCACATACAT cagggcgcagcgcgatgacGTCCAATATCTGAAATCTGC	287 321
F8EX23F F8EX23R	gtagcgcgacggccagtTTGACAGAAATTGCTTTTTACTCTG cagggcgcagcgcgatgacTCCCCAGTCTCAGATAACT	294 328
F8EX24F F8EX24R	gtagcgcgacggccagtACTGAGGCTGAAGCATGTCC cagggcgcagcgcgatgacCCCAACCACTGCTCTGAGTC	250 284
F8EX25F F8EX25R	gtagcgcgacggccagtTGGGAATTTCTGGGAGTAAATG cagggcgcagcgcgatgacAAGCTCTAGGAGAGGTGGTATTTTT	300 334
F8EX26AF F8EX26AR	gtagcgcgacggccagtCTGTGCTTTGACAGTACCAT cagggcgcagcgcgatgacTTCTACAACAGAGGAAGTGGTGA	557 591
F8EX26BF F8EX26BR	gtagcgcgacggccagtGGAGAAACCTGCATGAAAGC cagggcgcagcgcgatgacTTGGCCATCACAAATTTCAA	596 630
F8EX26CF F8EX26CR	gtagcgcgacggccagtTGCAAATGTGCATTTTTCTGA cagggcgcagcgcgatgacCCTCCAGCCCCCTTACTAT	580 614
F8EX26DF F8EX26DR	gtagcgcgacggccagtCCACCCCCATAAGATTGTGA cagggcgcagcgcgatgacCTGAAGAAACCAGCAGGAAAA	580 614
F8EX26EF F8EX26ER	gtagcgcgacggccagtCCCCAAAGGTGATATGGTTTT cagggcgcagcgcgatgacTCAGTGTTACATTTTTATTTC	230 264

Anexo 6

Inversión 22. Esta imagen fue tomada de Mühle C, Zenker M, Chuzhanova N, Schneider H. Hum Mutat. 2007 Oct;28(10):1045. En la figura los valores indican en tamaño de las regiones en kb, las letras P, Q, A, A2, A3 y B muestra los sitios de unión usados para la LD-PCR para la detección de la inversión relacionada con int22h. Las cajas negras representan los exones 1-22 y 23-26 del FVIII, las cajas grises indican las regiones que flanquean las copias extragénicas int22h2 e int22h3 que facilita la recombinación homóloga intergénica que da por resultado el primer evento. Los triángulos representan las secuencias Alu y L1 y su orientación. El proceso continua con la formación y estabilización del loop mediado por elementos de tipo Alu y L1, lo que permite la inserción de un fragmento externo al FACTOR VIII en este caso en el intrón 15, siendo este el segundo paso. El tercer paso lo constituye la recurrente recombinación entre las regiones int22h1 e int22h2 y el cuarto paso presumiblemente estaría compuesto por las deleción de exones del FVIII, contribuyendo a la complejidad del patrón resultante (21)

