

**AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD
DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA**

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD
DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA”**

Realizado por:

Marcela Alejandra Mardones Montanares

Director del proyecto:

Dr. Juan Carlos Navarro, Ph.D.

Como requisito para la obtención del título de:

MASTER EN BIOMEDICINA

Quito, 28 de Septiembre del 2021

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, **MARCELA ALEJANDRA MARDONES MONTANARES**, con cédula de identidad # 171027661-7, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento. A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



FIRMA

1710276617

**AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD
DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA**

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD
DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA”**

Realizado por:

Marcela Alejandra Mardones Montanares

como Requisito para la Obtención del Título de:

MASTER EN BIOMEDICINA

ha sido dirigido por el profesor

JUAN CARLOS NAVARRO

quien considera que constituye un trabajo original de su autor



FIRMA

**AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD
DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA**

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

JOSE RUBÉN RAMÍREZ-IGLESIAS

LINO ARISQUETA HERRANZ

Después de revisar el trabajo presentado,
lo han calificado como apto para su defensa oral ante
el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

DEDICATORIA

A mi familia por su amor y comprensión; a todos los pacientes, que viven con esta compleja enfermedad y a los profesionales del laboratorio que les apasione las coagulopatías.

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

AGRADECIMIENTO

A mi Dios, a mi familia y a todos los profesores de la SEK que brindaron su conocimiento para que pueda crecer como investigadora y profesional.

**AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD
DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA**

**“Avances moleculares en los tipos y subtipos de la enfermedad de von
Willebrand. Una revisión sistemática”.**

Marcela Mardones ^{1*} Juan Carlos Navarro^{1,2}

¹Universidad Internacional SEK, Maestría en Biomedicina
mamardones.mbme@uisek.edu.ec

²Universidad Internacional SEK, Grupo de Investigación de enfermedades
Emergentes, Epidemiología y Biodiversidad, Facultad de Ciencias de la Salud
juancarlos.navarro@uisek.edu.ec

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

Título corto o Running title: Investigación molecular en los subtipos de la enfermedad de von
Willebrand.

**AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD
DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA**

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Resumen

Contexto: La Enfermedad de von Willebrand es una patología heredada de diagnóstico complejo, considerada como un trastorno sanguíneo o coagulopatía; existen distintos tipos y subtipos; por lo que, se requiere de personal capacitado en el laboratorio para que las pruebas tanto convencionales y moleculares se efectúen exitosamente. En los últimos años, varias investigaciones han centrado sus esfuerzos en indagar cuáles son las mutaciones que se han dado de esta enfermedad y cómo llegar a su identificación; sin embargo, hay una ausencia de un estudio secundario que compile los hallazgos hasta la fecha, elemento que sería de gran utilidad para el clínico y para la comunidad científica. Este estudio tiene como finalidad realizar una revisión sistemática de la literatura que compile investigaciones primarias que analizan las distintas mutaciones y la utilidad de las pruebas convencionales para el diagnóstico de la EvW. En este sentido, se utilizó la metodología PRISMA que ayuda a identificar y sistematizar los estudios primarios que permitan dar cumplimiento al objetivo plantado. Se encontraron trece artículos, de alto impacto, que abordan el análisis de las mutaciones en función de las distintas pruebas diagnósticas. Estos estudios, por lo general se han llevado a cabo en países desarrollados y han sido avalados por institutos de alto nivel académico. Se concluye que las pruebas de laboratorio predilectas por la comunidad científica para investigar sobre la EvW es la FvW:Ag y la de FvW:VIIIc en combinación con la pruebas moleculares (PCR y secuenciación).

Palabras clave: Enfermedad de von Willebrand, laboratorio, investigación molecular.

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Abstract

Context: Von Willebrand disease is an inherited pathology of complex diagnosis, considered as a blood disorder or coagulopathy; there are different types and subtypes; therefore, trained personnel are required in the laboratory so that the tests, both conventional and molecular, are carried out successfully. In recent years, several investigations have focused their efforts on investigating what are the mutations that have occurred of this disease and how to reach its identification; however, there is an absence of a secondary study that compiles the findings to date, an element that would be very useful for the clinician and for the scientific community. This study aims to conduct a systematic review of the literature that compiles primary research that analyzes the different mutations and the usefulness of conventional tests for the diagnosis of VWD. In this sense, the PRISMA methodology was used to help identify and systematize the primary studies that allow compliance with the planted objective. Thirteen high-impact articles were found that address the analysis of mutations based on the different diagnostic tests. These studies have generally been carried out in developed countries and have been endorsed by institutes of high academic level. It is concluded that the laboratory tests preferred by the scientific community to investigate vwd are FvW:Ag and FvW:VIIIc in combination with molecular tests (PCR and sequencing).

Keywords: Von Willebrand disease, laboratory, molecular research.

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Índice de contenido

Índice de contenido	11
Introducción	14
Molécula del factor de von Willebrand y enfermedad de von Willebrand	16
Clasificación de la EvW	19
Desarrollo de aloanticuerpos en la EvW	29
Materiales y Métodos	30
Tipo de Estudio	30
Procedimiento Para la Revisión Sistemática	30
Criterios de Elegibilidad	31
Criterios de Inclusión	31
Criterios de Exclusión	31
Estrategia de Búsqueda	31
Proceso de Selección	31
Proceso de Recolección de Datos	31
Ítems de Extracción de Datos	32
Riesgos del Estudio	34
Evaluación de la Calidad de la Revisión Sistemática	34
Resultados	37
Caracterización de los artículos científicos	37
Pruebas de laboratorio convencionales y moleculares empleadas para investigar sobre la EvW	40

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Pruebas de laboratorio convencionales y moleculares en función de los diferentes tipos de la EvW.....	43
Síntesis de las pruebas empleadas para el estudio de la EvW	49
Características metodológicas de los estudios seleccionados	52
Discusión.....	54
Conclusiones y Recomendaciones	57
Referencias	58

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Estructura y función de la molécula de von Willebrand</i>	17
Figura 2. <i>Pruebas de Laboratorio y su relación con la EvW tipo 1 y 3 (Deficiencias cuantitativas).....</i>	19
Figura 3. <i>Clasificación de tipos de EvW por la presencia de multímero.....</i>	22
Figura 4. <i>Pro-pre péptido y FVW maduro</i>	23
Figura 5. <i>Estructura de la Glicoproteína Ib.....</i>	26
Figura 6. <i>Mutaciones encontradas en la molécula de VW.....</i>	29
Figura 7. <i>Diagrama de flujo para la selección de datos.....</i>	32
Figura 8. <i>Formulario de selección de datos.....</i>	32
Figura 9. <i>Revistas de publicación de los estudios primarios</i>	35
Figura 10. <i>Diagrama de burbujas que relaciona el tipo de prueba de laboratorio con el tipo de prueba convencional.....</i>	43
Figura 12. <i>Análisis cruzado de los las pruebas de laboratorio para la identificación de los distintos tipos de EvW</i>	48
Figura 13. <i>Pruebas convencionales</i>	50

**AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD
DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA**

Figura 14. *Pruebas moleculares* 52

Índice de Tablas

Tabla 1. *Caracterización de los artículos científicos* 38

Tabla 2. *Frecuencia de estudios según el tipo de EvW* 50

Tabla 3. *Tipos de EvW estudiados en los artículos seleccionados* 51

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Introducción

La enfermedad de von Willebrand (EvW) es la coagulopatía más común que corresponde a desórdenes hereditarios y que afecta al 1% de hombres y mujeres de la población según datos epidemiológicos mundiales (Flood, 2014). La molécula del factor de von Willebrand es un multímero con diferentes receptores que permiten su importante función en la hemostasia primaria y secundaria (Baronciani & Peyvandi, 2019), esto permite que según estudios del laboratorio se deba identificar subtipos de la enfermedad lo que hace que sea más complejo su diagnóstico (Stufano et al., 2017).

El Comité de Estandarización de la Sociedad de Trombosis y Hemostasia (ISTH) (P. James et al., 2021a) divide en tres grandes grupos la patología, la EvW tipo 1, es la que prevalece y se caracteriza por la disminución cuantitativa de la molécula; lo mismo ocurre en el tipo 3, solo que es mucho más grave esta disminución, lo que permite que la sintomatología del paciente sea evidente con fuertes sangrados. Por otro lado, está el tipo 2, caracterizada por cambios funcionales en la molécula, este tipo se clasifica en 2A, 2B, 2M y 2N; y a su vez, la 2A presenta subdivisiones (Castaman et al., 2014; Vangenechten & Gadisseur, 2020). Debido a la heterogeneidad de la molécula, muchas veces por pruebas convencionales del laboratorio no se evidencia el diagnóstico y el tipo de EvW; por lo que se requieren estudios moleculares, nuevas metodologías genómicas y tecnologías de secuenciación que, acorde al tipo de prueba aplicada, definen y permiten un diagnóstico certero, además el médico puede adecuar la terapia a utilizar según las particularidades del paciente (Goodeve, 2016).

Las pruebas de laboratorio convencionales y las más específicas como el cofactor a la ristocetina FvW:RCo han sido mejoradas de primera a cuarta generación; en la actualidad, también se utiliza la citometría de flujo. Otra de las pruebas corresponde al antígeno de von Willebrand FvW: Ag que mide la concentración de la glicoproteína en el plasma utilizando técnicas de enzima-inmunoensayo. La determinación de factor VIII- FVIII:C mediante métodos

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

coagulométricos o cromogénicos permiten conocer la cantidad del factor VIII circulante, y en muchas ocasiones podría darse una confusión con una hemofilia moderada si no se realizan todas las pruebas para el diagnóstico de EvW (Federici, 2014; Goodeve, 2016). El Factor de von Willebrand unido al colágeno FvW: CB es un método que utiliza diferentes tipos de colágeno para dar sensibilidad a los diferentes subtipos de la EvW. La agregación plaquetaria inducida por ristocetina (RIPA) a diferentes concentraciones, en cambio, permite evaluar la afinidad del FvW al receptor GPIb. Por su parte, el uso de electroforesis para la detección de los multímeros encontrados en la molécula de von Willebrand permite visualizar, según los pesos y tamaños, las bandas que conforman la molécula y que permite clasificar los subtipos de EvW. La capacidad de unión del FvW al factor VIII, FvW:FVIII B utiliza técnicas de enzima-inmunoensayo al igual que el estudio del propéptido de FvWpp. Todos estos ensayos basados en una muestra con plasma siguen siendo necesarios en el laboratorio para alcanzar el diagnóstico, sin embargo, en muchos de los casos, más aún cuando las pruebas moleculares todavía no están al alcance en todos los países, estas formas de evaluación son de difícil acceso (Baronciani & Peyvandi, 2019; P. James & Lillicrap, 2012)

A pesar de todas las pruebas que se realizan en el laboratorio con la muestra del paciente y tener una historia de sangrado familiar, todavía es posible que existan dudas en el diagnóstico de ciertos pacientes. Es por esta razón, que las pruebas moleculares han ido ganando espacio en los laboratorios y cada vez es más común la implementación de estas pruebas, en especial para diagnósticos de tipo 2A, 2B, 2M, 2N y tipo 3, que son alteraciones que presentan grandes deleciones, duplicaciones y mutaciones de cambio de sentido. El uso de técnicas como secuenciación de Sanger y secuencias de nueva generación (NGS) mejoran la capacidad de estudio de largas regiones que permiten detectar variantes o la posibilidad de conocer que el paciente tiene un alto riesgo de desarrollar inhibidores (Ng & Di Paola, 2018).

Por ello, en la presente investigación es relevante analizar las pruebas que se han

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

realizado en laboratorio para determinar los subtipos de la patología y la asociación que tienen las pruebas genéticas en la EvW y los inhibidores que podrían desarrollarse; mediante los documentos primarios y ubicar los avances que se proponen al abordar esta coagulopatía.

Mediante esta investigación se espera recopilar información sobre cómo se ha llevado a cabo la investigación sobre este tema y el trabajo de laboratorio documentado en la comunidad científica, sus resultados y la importancia de la implementación de pruebas moleculares en la investigación de la EvW que permitan dilucidar casos que presenten dudas, y reconocer cómo el laboratorio se torna una herramienta para lograr un diagnóstico certero y oportuno.

El trabajo de investigación está estructurado de la siguiente manera:

- Introducción
- Marco metodológico
- Análisis de resultados
- Conclusiones
- Bibliografía

A continuación, se presentan aspectos relacionados con la conceptualización de las variables que conducirán el presente estudio.

Molécula del factor de von Willebrand y enfermedad de von Willebrand

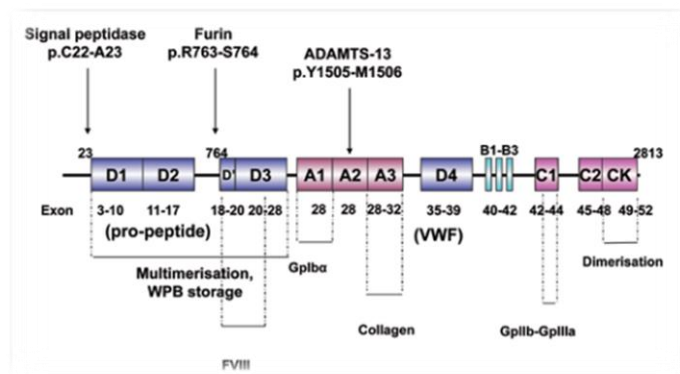
(Furlan, 1996) expone en su artículo la estructura multimérica de la molécula de von Willebrand, cuya función importante es de adhesión y agregación plaquetaria, esta molécula se une fuertemente a las glicoproteína GP1b α y GPIIb/IIIa y, además, es transportadora del factor VIII, estabilizándola para que no se degrade fácilmente. Cada subunidad de la molécula de von Willebrand tiene una función específica cuando se lesiona el vaso sanguíneo, se sintetiza en las células endoteliales y megacariocitos, lugar que presenta profundas interacciones y modificaciones intracelulares para cumplir con sus funciones.

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

El factor de von Willebrand es un producto de un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 22, formado por 741 aminoácidos que forman el pro péptido, que luego serán parte del dominio D1-D2, al final de su maduración tendrá 2050 aminoácidos que conformarán la proteína madura (Haberichter et al., 2008a) y que tendrá una estructura monomérica con los dominios D1, D2, D', D3, A1, A2, A3, D4, C1, C2, C3, C4, C5, C6, CK (Ver Figura 1) (Veyradier et al., 2016a).

Existen cambios en los niveles plasmáticos del factor de VW en pacientes sin EvW, como es el grupo sanguíneo “0”, se detectan niveles reducidos de FVIII y de VWF. La edad genera cambios de aumento de la cantidad de VWF, factores étnicos, en mujeres afroamericanas se detectan niveles más altos. Factores hormonales, en embarazo especialmente los niveles se ven aumentado tanto del FVIII, VWF y el puerperio. Se recomienda pasar esta fechas para determinar la existencia de la enfermedad (Woods et al., 2016)

Figura 1. Estructura y función de la molécula de von Willebrand



Nota: Formación del propéptido y de la estructura de la molécula de von Willebrand. La conformación de los dominios y de los lugares específicos de recepción a los diferentes ligandos que intervienen en hemostasia primaria (Berber, 2012).

En cambio, la enfermedad de von Willebrand refiere a un daño producido en la molécula y esto no permite cumplir con las funciones de adhesión y agregación; se transmite de forma autosómica dominante o recesiva y afecta tanto a hombres como a mujeres. El ISTH clasifica la patología en tres grupos 1 y 3 se refieren a un daño cuantitativo, el tipo 1 agrupa al subtipo

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

1C, el tipo 2 agrupa a subtipos 2A, 2B, 2M, 2N y refiere a un daño funcional en la molécula (P. James et al., 2021b). En tipo 2A se encuentran diferentes mutaciones que permiten realizar nuevamente otra clasificación 2A/IIA, IIC, IID y IID; que están relacionados con la manera de escisión de la ADAMTS-13, dimerización y ensamblaje de la proteasa (Vangenechten & Gadisseur, 2020) y el tipo 3, autosómica recesiva, se conoce como un tipo severo o grave de la enfermedad (James et al., 2021c).

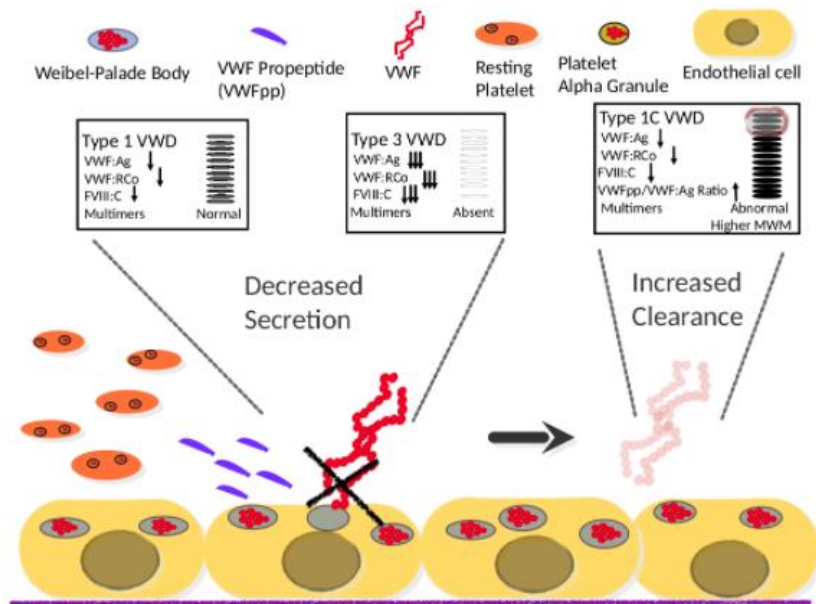
En este sentido, las pruebas de laboratorio para la detección de la EvW se clasifican desde las básicas o convencionales, las de segundo nivel y, hasta utilizar en la actualidad, pruebas moleculares. El uso de secuencias de nueva generación ha mejorado la manera de detección para la identificación de nuevas variantes y es importante indicar que esta tecnología no está disponible en todos los países por los altos costos que representan.

Las pruebas básicas o de rutina para los pacientes son aquellas que involucran el tiempo de sangrado estándar (ya no se debería realizar), en sustitución, actualmente se utilizan el PFA-100/200, el tiempo parcial de tromboplastina activada (TTPa) y el tiempo de protrombina (TP), son pruebas que no dan el diagnóstico pero ayudan como una guía para conocer la coagulopatía, también se realizará el hemograma que incluye a las plaquetas y es una característica del tipo 2B; presenta una trombocitopenia leve (Baronciani & Peyvandi, 2019). Como pruebas de primer nivel más específicas están la determinación de factor FVIII:C, evaluación de cofactor a la ristocetina (VWF: RCo), la concentración del antígeno de von Willebrand (VWF: Ag). En cambio, las pruebas de segundo nivel son: la unión del factor de VW al colágeno (VWF:CB), la agregación plaquetaria inducida con ristocetina (RIPA), multímeros de VWF y la unión del VWF al factor VIII (VWF:FVIII:B) (de Faria et al., 2016).

En la Figura 2, se presentan las pruebas mencionadas en relación a los tipos 1 y 3 de la EvW (Di Paola, 2021).

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Figura 2. Pruebas de Laboratorio y su relación con la EvW tipo 1 y 3 (Deficiencias cuantitativas)



Es importante mencionar que en esta revisión sistemática y metaanálisis no se considerarán estudios relacionados con la EvW adquirida, más bien lo que se busca es agrupar las pruebas utilizadas según cada tipo y subtipo de la enfermedad, además de agrupar y conocer más sobre las mutaciones que se pueden encontrar en esta patología según las últimas investigaciones.

Clasificación de la EvW

La clasificación de la EvW está supeditada a los resultados obtenidos de las pruebas en el laboratorio aplicadas para la detección de la enfermedad. Para el tipo 1 y 3 se utiliza generalmente la técnica “sandwich” en la prueba de enzima inmuno ensayo (ELISA), utilizando anticuerpos monoclonales *rabbit-antihuman-VWF*. La técnica de inmuno ensayo en látex (LIA), es una metodología ampliamente utilizada, aunque podría presentar interferencias con anticuerpos heterófilos o la artritis reumatoidea (Favaloro et al., 2016).

En la prueba de ELISA cada laboratorio debe obtener su “*cutt off*”, que permita diferenciar entre los reales pacientes con EvW, los pacientes en “límite bajo” y los pacientes sanos; la interpretación fenotípica de cada individuo importa también en el diagnóstico.

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

En el subtipo 1C, se utiliza el *rabbit-antihuman -VWFpp*, un anticuerpo policlonal, utilizando (ELISA) el radio obtenido entre VWFpp/VWF:Ag resulta alto y el mismo resultado se presentan en algunos subtipos 2. La prueba utilizada para el estudio de propéptido se realiza por ELISA, y no todos los laboratorios pueden realizar la prueba.

La actividad VWF es el llamado cofactor a la ristocetina VWD:RCo y refleja la capacidad de la interacción con el receptor glicoproteico en las plaquetas GpIb α . Es una prueba muy importante para clasificar los subtipos de VW pero también es importante al tipificar la EvW, también para monitorear la terapia de reemplazo del paciente en episodios hemorrágicos. Lamentablemente como es una prueba que no se realiza en condiciones fisiológicas presenta una alta variabilidad y limitaciones de sensibilidad mas aún cuando los niveles de FVW:Ag son <10 IU/dL (Baronciani & Peyvandi, 2019).

El factor VIII, se determina utilizando ensayos en un solo paso coagulométricos o métodos cromogénicos y podrán encontrarse diferentes valores según los diferentes casos encontrados en la EvW. En el tipo 3 se encuentran valores <10 IU/dL (Baronciani & Peyvandi, 2019).

El estudio de multímeros, utilizando electroforesis en agarosa/ dodecilsulfato sódico (SDS), lo que se espera es observar las diferentes bandas con diferentes pesos moleculares y que conforman el multímero de la molécula de VW.

La prueba VWF: CB es la unión del factor de VW unida al colágeno, se realiza por inmunoensayo y resulta ser una manera de diferenciar a falta de la prueba de multímeros los tipos 2A y 2B del tipo 2M, usando colágeno del tipo I al III, identifican la mutación en el dominio A3 con una disminución en la capacidad de FVW unido al colágeno y un patrón normal multimérico (tipo 2M). Existen otros colágenos del IV al VI que buscan identificar mutaciones en el dominio A1 (Baronciani & Peyvandi, 2019).

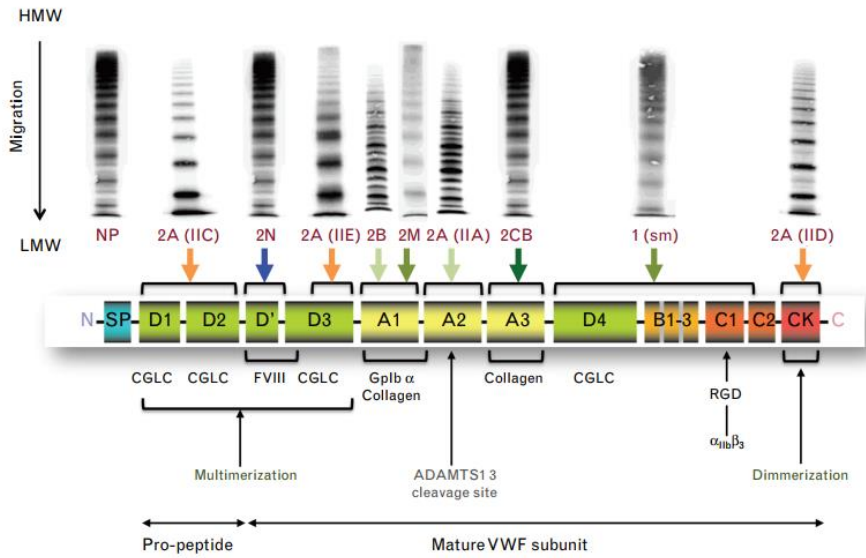
AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

La prueba de VWF: FVIIIb, es la capacidad de factor de VW de unirse al FVIII, se utilizan las pruebas de ELISA y diferencia el tipo 2N (enfermedad autosómica recesiva) de hemofilia moderada (enfermedad ligada al cromosoma x). Además, identifica portadores asintomáticos con afectación del dominio D3 (Baronciani & Peyvandi, 2019).

Por último, la prueba de agregación plaquetaria inducida por ristocetina (RIPA) se ve influenciada por la cantidad de VWF:Ag, la ausencia de multímeros de alto peso molecular y presencia de mutaciones en el dominio A1, corresponden a este grupo el tipo 2B y 2M y el receptor de tipo plaquetario GpIb α ; por esta razón esta prueba puede ser utilizada para diferenciar el tipo 2B del tipo 2A y 2M (Baronciani & Peyvandi, 2019).

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Figura 3. Clasificación de tipos de EvW por la presencia de multímero



Nota: Composición y presencia de los multímeros en la molécula del FVW con los subtipos de la EvW (Stockschlaeder et al., 2014)

EvW tipo 1

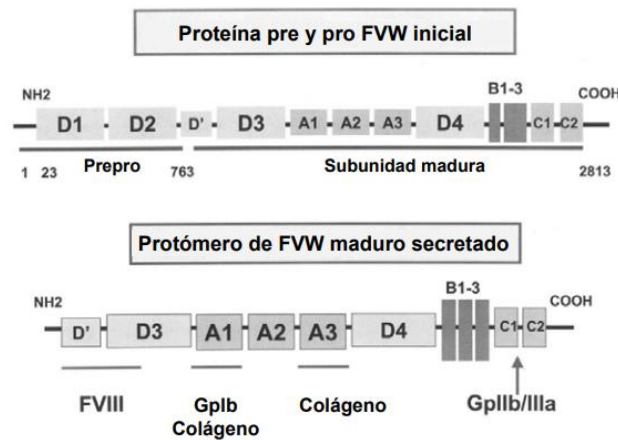
Se la conoce como la patología más común dentro de la EvW, se transmite de manera autosómica dominante, los niveles de la molécula serán menores a 50 IU/dL y son conocidos como “EvW nivel bajo”, con una parcial deficiencia y la funcionalidad normal de la molécula, el 30% de estos pacientes no presentan mutaciones lo que hace pensar que son otros factores que intervienen en su descenso como son los pacientes con grupo sanguíneo “0”; en pacientes que presentan valores menores a 30 IU/dL, son considerados reales pacientes con la patología y se relacionan con la presencia de hemorragias fácilmente (Baronciani, Goodeve, & Peyvandi, 2017).

Los cambios encontrados en las pruebas convencionales son la disminución en VWF:Ag, FVIII:C, VWF:RC₀, VWF:CB. El análisis multimérico de la molécula es normal y RIPA estará normal, a menos que la cantidad de VWF:Ag sean < 10-20 U/dL (Favaloro, 2011)

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Tanto el pro péptido como el péptido maduro del FVW, se asocian por enlaces no covalentes y, al salir a circulación el propéptido como homodímero, tiene un tiempo de vida de 2-3 horas a diferencia del FVW maduro que llega a durar de 8-12 horas. Es por esta razón que se utiliza el radio VWFpp y VWF:Ag para indicar la baja duración del FVW. (Haberichter et al., 2008) demuestran la presencia de una mutación del subtipo 1C, que produce un aclaramiento más rápido del factor de von Willebrand; es decir, de una supervivencia más corta a nivel plasmático con una disminución en su secreción o una retención en los cuerpos de *Weibel Palade* o en los gránulos alfa de los megacariocitos/plaquetas que es el lugar de depósito. Es importante mencionar que el uso de desmopresina como terapia en los pacientes con esta mutación, no tiene el efecto esperado y es una de las razones del estudio de estas mutaciones en pacientes con EvW que utilizan los concentrados VWF/FVIII (Federici, 2014).

Figura 4. Pro-pre péptido y FVW maduro



Nota: Se observa una estructura pre péptido de 22 aminoácidos, el propéptido de 741 aminoácidos y la molécula madura tiene 2050 aminoácidos, además se indican sitios de unión para el FVIII, la Gpllb/IIIa, y para el colágeno (Lilicrap, 2008).

MUTACION: Son mutaciones de cambio de sentido en el 10-20% de los casos, que acortan la supervivencia de VWF, R1205H (variante Vicenza) aparece en pacientes cuando fenotípicamente presenta < 20/39 IU/dL de VWF: Ag, también se encuentra la mutación C1130 (Haberichter et al., 2008b) (Woods et al., 2016), resultado de la sustitución de tirosina a cisteína

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

en el codón 1584 (Tyr1584Cys), los casos encontrados en pacientes se muestran con cantidades bajas de FVW (Swystun & James, 2017a). Estudios realizados en Reino Unido, Unión Europea y Canadá, demuestran que las variaciones se encuentran localizadas a lo largo de todo el gen (Bellissimo et al., 2012a).

EvW tipo 2

Subtipo 2A VWD

Es un trastorno autosómico dominante, el 10% de todos los casos de EvW se caracterizan por disminución funcional del FVW en unión a plaquetas como resultado de la pérdida alta o intermedia de multímeros (HWM). Las pruebas que son alteradas en VWF:RCo/VWF:Ag y VWF:CB/VWF:Ag son indicadores que deberán estar <0.7 (Favaloro, 2011). En los pacientes con esta condición se han encontrado alrededor de 50 mutaciones diferentes relacionadas con las siguientes posibilidades:

1. Mayor susceptibilidad a la proteólisis mediada por ADAMTS-13
2. Ensamblaje de dímero y multímero deteriorado
3. Pérdida en la regulación del almacenamiento
4. Retención intracelular (Swystun & James, 2017b)

Con respecto a la mutación, ésta ocurre frecuentemente en el dominio A2 que corresponde al sitio de escisión de ADAMTS-13, pero también se ha encontrado en otros dominios relacionados en la multimerización D'D3,CK y el propéptido FVW (D1 al D2) (Swystun & James, 2017b); para determinarla, se debe estudiar el extremo 3' del exón 28. En el tipo IIE, en cambio, se deberá estudiar los exones 22, 25 y 27 y el extremo 5' del exón 28. Para el tipo IID se requiere investigación de exones 51-52. El tipo IIC, se hereda de manera recesiva y se estudian exones 2-17 con mutaciones en el dominio D1, exones 6-7 y exones 11-15 (Baronciani,

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Goodeve, & Peyvandi, 2017). Las mutaciones de los exones 22 y 25 -28 p.Cys1130 son comunes y p.Arg1205His permite al FVW un rápido aclaramiento (Goodeve, 2016).

El tipo 2A se clasifica a su vez en el Tipo IIA que afecta dominio A2; el tipo IIE, afecta dominio D3 y retiene intracelularmente (HMW) reduce la proteólisis por ADAMTS-13; tipo IIC, se afecta dominio D1-D2 que participan en la multimerización del FVW. Tipo IID, se afecta dominio CK que participa en la dimerización del FVW.

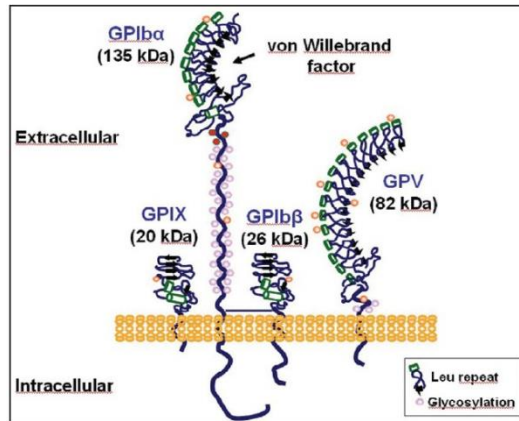
En lo que corresponde al subtipo 2B VWD, este es un trastorno autosómico dominante que afecta a <5% de la población en total. Este tipo se origina por mutación en cambio de sentido (*missense mutation*) en la unión con la glicoproteína GpIb; además, produce una mayor interacción con las plaquetas y aumenta la proteólisis de la ADAMTS-13. Por lo tanto, produce la pérdida de multímeros de alto peso molecular (HMW) y la consecuente trombocitopenia. Las relaciones entre VWF:RCo/VWF:Ag y VWF:CB /VWF:Ag son <0.7, lo que puede dar confusiones con pacientes 2A, en lugares donde no se realiza RIPA (Favaloro, 2011). En este tipo de pacientes, no se recomienda dar la desmopresina porque podría empeorar el cuadro de trombocitopenia, esta es una de las razones para llegar al diagnóstico definitivo y mejorar la terapia en el paciente.

Se debe mencionar la EvW tipo plaquetario (PT-VWD) llamada pseudo-EVW tipo plaquetario, que podría dar a confusión, caracterizada por una mutación que afecta la Gp1b α y que permite una ganancia de su función. La mutación de este tipo se hereda como un defecto autosómico dominante y es un daño encontrado en las plaquetas; la mutación se encuentra localizado en el cromosoma 17 y se han reportado cuatro mutaciones: Gly233Val, Met239Val y Gly233Ser que son de cambio de sentido (*missense*); y la última mutación es una delección en 27pb que codifican para la región de la Gp1b α , ésta provoca una ganancia de actividad hacia la

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

unión del multímero de VW y por lo tanto, en circulación las plaquetas se ven disminuidas. Actualmente, se han detectado más de 20 mutaciones (Favaloro, 2008)

Figura 5. Estructura de la Glicoproteína Ib



Nota: Se muestra el complejo formado por diferentes subunidades Gp1b α , Gp1b β , GpIX, y GpV (François Lanza Université Louis Pasteur, 2014).

Por su parte, la mutación del subtipo 2B se hereda de forma autosómica dominante y es una alteración encontrada en el FWF en el dominio A1, entre p.Glu1260 y p.Gly1479. Para su identificación se debe investigar 5' del exón 28. Mutación cambio de sentido entre p.Trp246 y p.Asp265 y una delección del cambio de lectura de 27pb Pro449_Ser457 del 1345_1371 del 27.

Se detectan como 52 mutaciones en el exón 28 localizado en el cromosoma 12.

En lo que respecta al subtipo 2N EvW, este se hereda de forma autosómica recesiva. Es conocida como “EvW Normandy” porque fue detectado en padres consanguíneos, la mutación se origina en un cambio de la treonina en la posición 791 del pre-pro péptido FVW por la metionina (T791M). Este subtipo es originario de Normandía, de igual manera, no es una patología común ya que afecta a <5% de la población, en este tipo se detecta una alteración en el que FVW se une de manera deficiente al FVIII y se ve reflejada en el paciente como una

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

aparente hemofilia moderada. Para el diagnóstico se utiliza las pruebas VWF:FVIII y la relación VWF:FVIII/VWF:Ag cuyo valor <0.7 indicaría la presencia de la enfermedad.

Existen mutaciones del subtipo 2N EvW, el cambio se produce en Arg854Gln y aparece en forma homocigota. Los defectos se identifican en los primeros 272 residuos de la subunidad madura, dominio D y una parte del D3, codificado por exones del 17-25 (Baronciani, Goodeve, & Payvandi, 2017). En la publicación realizada por (Mazurier et al., 2001), la mutación R854Q se presenta en pacientes homocigotos y heterocigotos; además, las mutaciones que aparecen en los exones 18-27 que contienen algunos aminoácidos N-terminal, son los que contienen el dominio para la unión a la molécula del FVIII. Las mutaciones puntuales están localizadas en el exón 18-20 y afecta a los aminoácidos 764-1035 del pre-pro-FVW. Se han detectado pocas mutaciones en los aminoácidos localizados fuera de la unión al dominio de FVIII, lo que significa que algunas mutaciones pueden afectar indirectamente la unión de FVW al FVIII cambiando su conformación.

Otro de los subtipos es el 2M EvW, este se hereda como un trastorno dominante. Al igual que los otras EvW tipo 2, este corresponde a defectos cualitativos que puede presentar una variedad de defectos funcionales, pero no están asociados a una baja cantidad de HMW FVW. Por lo tanto, la prueba de multímeros no se ve alterada. De igual manera, el VWF:RCo está alterado por la unión defectuosa que presenta con la GpIb α , afecta al dominio A1 o al colágeno que afecta a los dominios A1 y A3. Mientras que la relación VWF:RCo/VWF:Ag es baja, la relación VWF:CB/VWF:Ag puede ser normal cuando el defecto que se produce es con la plaqueta y se encontrará $<0.5-0.7$, y es baja cuando el defecto es por unión al colágeno (Favaloro et al., 2014).

Las mutaciones de 2M EvW de cambio de sentido (*missense*) se localizan con frecuencia en el dominio A1 y están relacionados con la baja capacidad del FvW de unirse a la

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

GpIb α . Para identificarlo, se estudian los extremos 5' del exón 28, similar al tipo 2B; sin embargo, el tipo 2M tiene una baja capacidad de unirse al colágeno, en este caso se observa cambios en el dominio A3, y se investigan los exones 29-32 (Baroncini, Goodeve, & Payvandi, 2017).

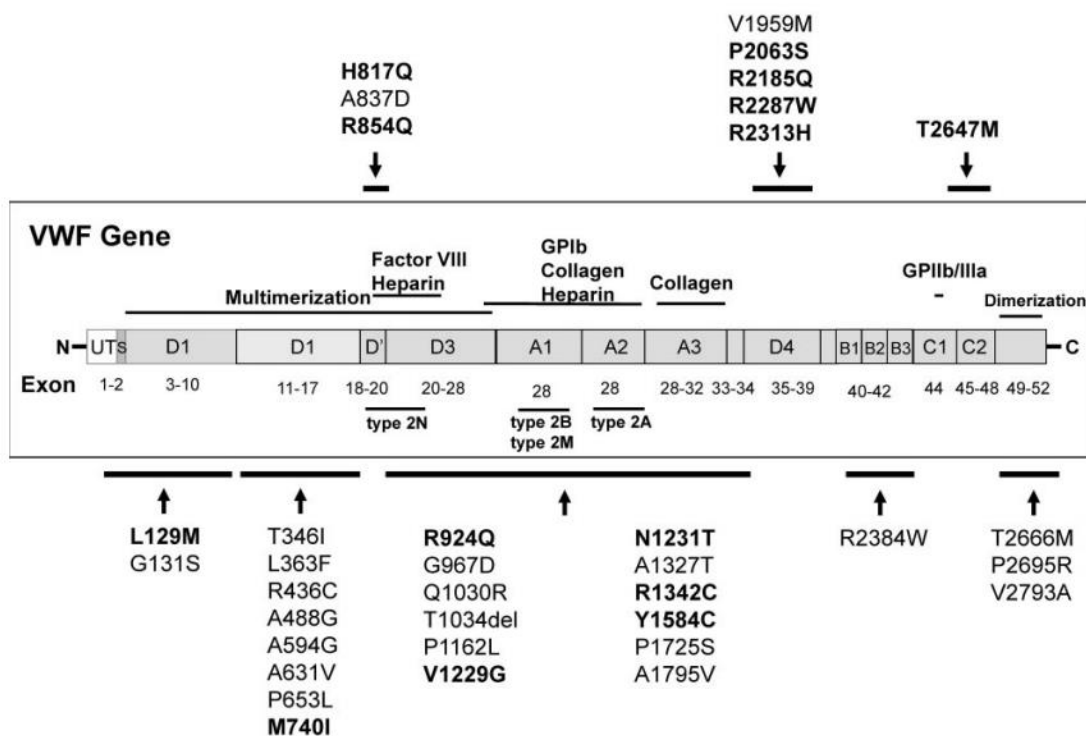
EvW tipo 3

Este tipo de EvW se caracteriza por ser una enfermedad autosómica recesiva, con una frecuencia entre el 0.5 y 5.3/1 000 000 de individuos. En las pruebas de laboratorio no se detecta el antígeno de FW, el FVIII está muy disminuido <10%, tampoco aparecen multímeros en el corrimiento electroforético y con RIPA no hay respuesta con la ristocetina. Por tal razón, las pruebas moleculares no se realizan frecuentemente, porque con las pruebas del laboratorio convencionales se llega al diagnóstico. Este tipo de patología se acompaña de cambios fenotípicos como es la presencia de sangrados en especial en las mujeres, para lo que requieren tratamiento específico (Roberts & Flood, 2015).

Es posible encontrar mutaciones puntuales y mutaciones sin sentido como R1659X en el exón 28. También hay la presencia de la mutación de cambio de sentido y la delección, la más importante es c.2435C en exón 18 y se correlaciona con un rápido aclaramiento en la molécula de VW en circulación. La mutación p.C2754W causa severa dimerización y se ubica en el dominio CK, con presencia de bandas adicionales de monómeros en la electroforesis. Además, la mutación p.C1169W afecta el dominio D3 (Schneppenheim & Budde, 2011). Finalmente, (Bowman et al., 2017), publicaron una nueva variante encontrada en familias canadienses (c.8419_8422dupTCCC, p.Pro2808-Leufs*24) con variaciones fenotípicas en los sangrados que se pueden presentar. Los cambios presentados a nivel fenotípico pueden ir desde transporte intracelular defectuoso hasta una secreción defectuosa en la dimerización.

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Figura 6. Mutaciones encontradas en la molécula de VW



Nota: Se observan nuevas mutaciones en la molécula de VW, las que se muestran en negrilla son mutaciones encontradas anteriormente (Bellissimo et al., 2012b).

Desarrollo de aloanticuerpos en la EvW

La presencia de aloanticuerpos es una condición rara que representa una seria complicación para el tratamiento de la EvW, la prevalencia oscila entre el 5 y 10% en pacientes con la EvW tipo 3. Son aloanticuerpos o autoanticuerpos que participan como anticuerpos neutralizantes (A. James et al., 2016). Los síntomas son variados, como la falta de respuesta a la infusión de concentrados de VWF hasta reacciones analifácticas en casos raros. Se observa en pacientes que presentan múltiples transfusiones, es decir que presentan grandes deleciones o mutaciones; las pruebas del laboratorio no están del todo estandarizadas, pero existen pruebas de ELISA para su detección utilizando anticuerpos policlonales de tipo IgG, con reconocimiento para el epítipo del VWF (James et al., 2013).

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Materiales y Métodos

Tipo de Estudio

El tipo de investigación es de revisión sistemática, es decir, es un estudio que busca evaluar e interpretar y evaluar la investigación disponible relativa a un área de interés. Existen investigaciones de carácter primario y secundario. Los estudios primarios son aquellos relativos a algún tema de investigación y la obtención se da a través de fuentes directas; en cambio, los estudios secundarios compilan y analizan los estudios primarios relativos a un fenómeno en particular. Para la revisión de la literatura, se pueden seguir dos métodos, uno informal y otro formal; la presente investigación, se rige a este último, que corresponde a una metodología confiable, rigurosa, sistemática, repetible y extendida a la comunidad científica (Kitchenham, 2004b).

Procedimiento Para la Revisión Sistemática

Para la realización del presente estudio se siguen las recomendaciones de la propuesta metodológica llamada PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*) (Page et al., 2021a). Las preguntas de investigación que se plantean responder en el presente estudio son:

1. ¿Cuáles son las pruebas de laboratorio que más se han empleado para investigar sobre la EvW?
2. ¿Cómo se ha llevado a cabo el análisis de mutaciones de los distintos tipos de EvW?
3. ¿Qué pruebas moleculares se utilizan para diagnosticar los diferentes tipos de EvW?
4. ¿Cuáles son las características de los estudios en función de la metodología de investigación aplicada?

La cual consta de los aspectos descritos a continuación.

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Criterios de Elegibilidad

Criterios de Inclusión

En la presente revisión sistemática se incluyeron estudios primarios que abordan aspectos de la investigación molecular y/o de laboratorio en uno o varios subtipos de la EvW. Se seleccionaron los artículos publicados en inglés.

Criterios de Exclusión

No se consideran aquellos artículos que sean de revisión sistemática, cartas al editor, ni actas de conferencia, en cuanto a los capítulos de libros, se evaluaron si han sido revisados por pares ciegos, en caso de que no, se descartan.

Estrategia de Búsqueda

La búsqueda de los artículos primarios no se restringió a un periodo de tiempo, esto debido a que se busca conocer el estado actual del conocimiento e identificar el periodo en el que se ha desarrollado en mayor medida investigaciones de este tema. La búsqueda se realizó en librerías digitales PubMed, SringerLink y ScienceDirect, ya que en ellas están contenidas colecciones especializadas de una rama específica del conocimiento. Las palabras clave utilizadas en la búsqueda en las librerías mencionadas fueron: *mutation, von Willebrand disease, subtypes, laboratory*; la búsqueda en el Título, Palabras clave y Resumen.

Proceso de Selección

Para la identificación y selección de los elementos que conformarán parte de esta investigación, se siguió las recomendaciones del diagrama de flujo propuesto por (Page et al., 2021) los cuales se detallan en la Figura 7.

Proceso de Recolección de Datos

Previo al procesamiento de información, se diseñó un formulario de extracción de datos que contempla aquellos aspectos a ser analizados (ver Figura 8). Posteriormente, la información fue sistematizada en una matriz EXCEL.

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Ítems de Extracción de Datos

Para extraer los datos, se utilizó el listado propuesto para el formulario de extracción de datos otorgado por PRISMA (Page et al., 2021b); sin particularmente, se consideraron para el registro y análisis los criterios de extracción planteados en la

Figura 8. Tras la aplicación de la cadena de búsqueda y el tamizaje de los artículos científicos, se encontró que doce cumplen con los criterios de inclusión y no con los de exclusión.

Figura 7. Diagrama de flujo para la selección de datos

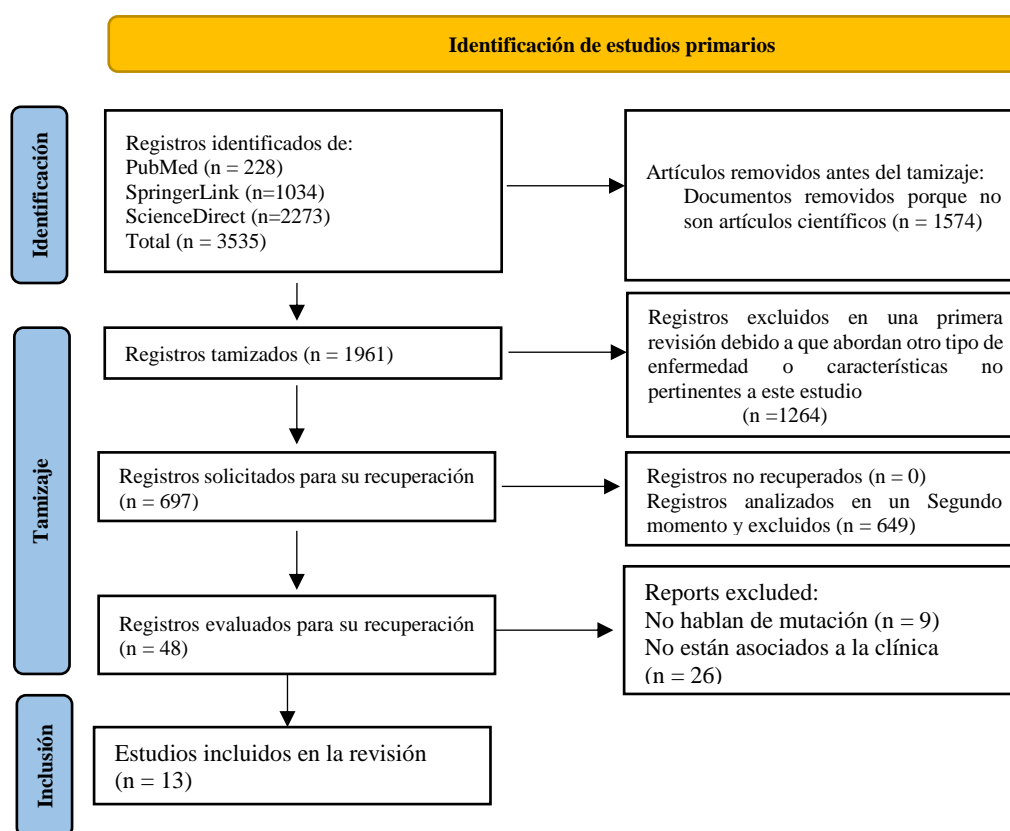


Figura 8. Formulario de selección de datos

Caracterización de los estudios seleccionados	
<input type="checkbox"/> Título	<input type="checkbox"/> País
<input type="checkbox"/> Autores	<input type="checkbox"/> Número de citas
<input type="checkbox"/> Año	<input type="checkbox"/> Cuartil
<input type="checkbox"/> Revista	<input type="checkbox"/> Objetivo del estudio
Aspectos relacionados con la EvW	
1. Pruebas de laboratorio	
<input type="checkbox"/> Convencional	

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

<input type="checkbox"/> Molecular <input type="checkbox"/> Citometría de flujo	
2. Pruebas convencionales	
<input type="checkbox"/> FvW: Ag <input type="checkbox"/> FvW: Rco <input type="checkbox"/> Actividad de FVIII <input type="checkbox"/> FvW: CB <input type="checkbox"/> FvW: pp	<input type="checkbox"/> RIPA <input type="checkbox"/> Multímeros <input type="checkbox"/> Tipo de sangre ABO <input type="checkbox"/> FvW: FVIII B <input type="checkbox"/> Aloanticuerpos
3. Tipos de EvW	
4.1. EvW 1 <input type="checkbox"/> FvW: Ag <input type="checkbox"/> FvW: Rco 4.2. EvW 2 <input type="checkbox"/> 2A: IIA <input type="checkbox"/> 2A: IIE <input type="checkbox"/> 2A: IIC <input type="checkbox"/> 2A: IID <input type="checkbox"/> 2B <input type="checkbox"/> 2N <input type="checkbox"/> 2M <input type="checkbox"/> No clasificado	4.3. EvW 3 4.4. EvW 4
4. Pruebas moleculares	5. Análisis de mutaciones
<input type="checkbox"/> PCR <input type="checkbox"/> Secuenciación <input type="checkbox"/> Análisis bioinformático	<input type="checkbox"/> Número <input type="checkbox"/> DB
6. Árbol genealógico	7. Comité de bioética
<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
8. Conclusiones	
Aspectos metodológicos	
9. Fondos o Grants	
10. Tipo de investigación	10.1. Según el propósito
	<input type="checkbox"/> Puro, básico o fundamental <input type="checkbox"/> Puro aplicado <input type="checkbox"/> Investigación personal <input type="checkbox"/> Investigación institucional <input type="checkbox"/> Investigación social
	10.2. Según el método de análisis
	<input type="checkbox"/> Inductivo <input type="checkbox"/> Deductivo <input type="checkbox"/> Dialéctico
	10.3. Según el lugar de la investigación
	<input type="checkbox"/> Laboratorio <input type="checkbox"/> Campo
	10.4. Según la relación al tiempo
<input type="checkbox"/> Estudio retrospectivo <input type="checkbox"/> Estudio prospectivo	
10.5. Según la secuencia del estudio	

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

	<input type="checkbox"/> Estudio transversal <input type="checkbox"/> Estudio longitudinal
	10.6. Según el diseño de investigación
	<input type="checkbox"/> Descriptivo exploratorio <input type="checkbox"/> Analítico de cohorte <input type="checkbox"/> Caso clínico o estudio de caso <input type="checkbox"/> Analítico de casos y controles <input type="checkbox"/> Experimentales o cuasi experimentales
11. Criterios para la selección de casos	
<input type="checkbox"/> Criterios de inclusión <input type="checkbox"/> Criterios de exclusión	
12. Finalidad del cuestionario	
13. Naturaleza de las unidades de análisis	
14. Aproximación	
<input type="checkbox"/> Nueva <input type="checkbox"/> Continuidad	

Riesgos del Estudio

El riesgo principal que se presentó durante la ejecución de esta revisión sistemática es que no se tenga disponibilidad de un estudio primario seleccionado; frente a ello, se contactó con los expertos solicitando la información. Otro de los riesgos encontrados fue la heterogeneidad de la naturaleza de las investigaciones estudiadas, por ello, se aplicó modelos estadísticos que se ajusten a esta realidad.

Para asegurar la calidad del análisis, se consideraron propiedades que permitan mitigar los sesgos, por ejemplo, la utilización de la literalidad. Dos amenazas a la validez también deben ser consideradas para evitarlas; por un lado, la validez interna, esta hace referencia a la calidad de los resultados que deriven del estudio; para ello, es necesario establecer un protocolo que conduzca la revisión y definir, un formulario de extracción de datos. Además, los estudios son evaluados desde el número de citas que posean hasta el cuartil al que pertenezcan las revistas publicada.

Evaluación de la Calidad de la Revisión Sistemática

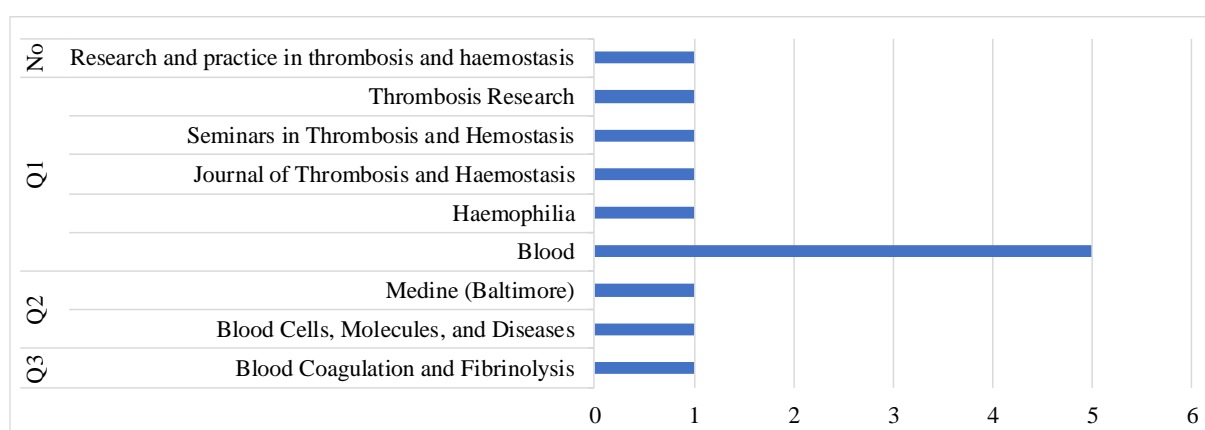
(Kitchenham, 2004a) señala que la evaluación de la calidad de una revisión sistemática refiere a la caracterización detallada del protocolo de la revisión, la calidad de los criterios de

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

selección y la calidad de los estudios primarios que forman parte del estudio. Para garantizar la calidad del protocolo de la revisión, se siguió lo establecido por (Page et al., 2021) en el modelo PRISMA. En lo que respecta a la calidad de los criterios de extracción; se eligieron clasificadores formales previamente establecidos; de tal forma que se aborden la mayor cantidad posible de criterios de análisis.

Finalmente, en lo que respecta la evaluación de la calidad de los estudios primarios, se consideraron dos indicadores. Por un lado, la calidad de los estudios en función del impacto de la revista de publicación, para ello, se consideró los cuartiles (Q). Un cuartil es un indicador que “se utiliza para evaluar la importancia relativa de una revista en función del total de revistas de su área” (Biblioteca Universitaria Unibersitateko Liburutegia, 2021). Se consideró, para la determinación del cuartil, la plataforma *Scimago Journal & Country Rank*, debido a que es de acceso abierto. En la Figura 9, se presenta el listado de revistas que albergan las publicaciones que conforman este estudio. Se encontró que 8 de los 13 estudios primarios están publicados en revistas Q1, particularmente la revista *Blood* de la Sociedad Americana de Hematología ha sido preferida por los expertos.

Figura 9. *Revistas de publicación de los estudios primarios*



En la Figura 9, En la Tabla 1 se presenta la caracterización de los estudios seleccionados para el presente meta-análisis, se observa que los estudios que *analizan* las mutaciones de la EvW *se* empiezan a registrar en el 2001. Las *revistas* en las que han sido publicados destacan

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

por ser de alto impacto, es decir, pertenecen, por lo general al cuartil Q1 (n=9) y al Q2 (n=2). La revista predilecta es Blood (n= 5) que está a cargo de la Sociedad Estadounidense de Hematología; también, se ha publicado sobre el tema en Australia, Eslovenia, Italia, Irlanda, Bélgica, Canadá, Alemania, Francia, Hungría y, en Latinoamérica, en Argentina. Se registraron 7 bases de datos de las cuales los investigadores obtuvieron la información para sus estudios. Finalmente, los artículos científicos analizados a más de ser registrados en revistas de alto impacto, han sido altamente citados.

Tabla 1

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Resultados

En este capítulo se presenta una síntesis de los hallazgos encontrados en los trece artículos científicos previamente seleccionados. En una primera instancia, se procede a la caracterización de las investigaciones; esto es importante para determinar las condiciones particulares que distinguen la estructura del cómo se han llevado a cabo los diferentes estudios. Posteriormente se presenta una síntesis de las pruebas de laboratorio empleadas para investigar sobre la EvW; además, del análisis de mutaciones de los tipos de EvW y del tipo de pruebas moleculares. Por último, se presentan las características de los estudios en función de la metodología de investigación empleada.

Caracterización de los artículos científicos

En la Tabla 1 se presenta la caracterización de los estudios seleccionados para el presente meta-análisis, se observa que los estudios que analizan las mutaciones de la EvW se empiezan a registrar en el 2001. Las revistas en las que han sido publicados destacan por ser de alto impacto, es decir, pertenecen, por lo general al cuartil *Q1* (n=9) y al *Q2* (n=2). La revista predilecta es *Blood* (n= 5) que está a cargo de la Sociedad Estadounidense de Hematología; también, se ha publicado sobre el tema en Australia, Eslovenia, Italia, Irlanda, Bélgica, Canadá, Alemania, Francia, Hungría y, en Latinoamérica, en Argentina. Se registraron 7 bases de datos de las cuales los investigadores obtuvieron la información para sus estudios. Finalmente, los artículos científicos analizados a más de ser registrados en revistas de alto impacto, han sido altamente citados.

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Tabla 1. *Caracterización de los artículos científicos*

Cod.	Título	Revista	Año	Nro. de Citas	Q	País	Base de datos	Nro. de mutaciones encontradas
R01	VWF mutations and new sequence variations identified in healthy controls are more frequent in the African-American population	Blood	2011	93	Q1	EEUU	-VWFdb ¹	14
R02	Von Willebrand factor alloantibodies in type 3 von Willebrand disease	Blood Coagulation and Fibrinolysis	2019	1	Q3	Eslovenia	-	1
R03	Comparative assessment of von Willebrand factor multimers vs activity for von Willebrand disease using modern contemporary methodologies	Haemophilia	2020	11	Q1	Australia	-	0
R04	Evaluating errors in the laboratory identification of von Willebrand disease in the real world	Thrombosis Research	2014	58	Q1	Australia	-	0
R05	Novel insights into the clinical phenotype and pathophysiology underlying Low VWF levels	Blood	2017	75	Q1	Irlanda	The Human Gene Mutation Database ² Coagulation Factor Databases ³	No especificado
R06	Molecular defects in type 3 von Willebrand disease: updated results from 40 multiethnic patients	Blood Cells, Molecules, and Diseases	2003	130	Q2	Italia	-	45
R07	Common large partial VWF gene deletion does not cause alloantibody formation in the Hungarian type 3 von Willebrand disease population	Journal of Thrombosis	2011	16	Q1	Hungría	VWFdb ¹	15

¹ <http://www.VWF.group.shef.ac.uk/>

² www.hgmd.cf.ac.uk

³ www.eahad-db.org

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

R08	Phenotypic Parameters in Genotypically Selected Type 2B von Willebrand Disease Patients: A Large, Single-Center Experience including a New Novel Mutation	and Haemostasis Seminars in Thrombosis and Hemostasis	2017	6	Q1	Argentina	PolyPhen-2 ⁴ SIFT ⁵ UniProt KB ⁶	1
R09	A Laboratory Phenotype/Genotype Correlation of 1167 French Patients From 670 Families With von Willebrand Disease: A New Epidemiologic Picture	Medine (Baltimore)	2016	46	Q2	Francia	EAHAD Coagulation Factor Variant Databases ⁷	278
R10	Identification and functional characterization of a novel 27-bp deletion in the macroglycopeptide-coding region of the GPIBA gene resulting in platelet-type von Willebrand disease	Blood	2005	81	Q1	Canada	0	1
R11	Identification of type 1 von Willebrand disease patients with reduced von Willebrand factor survival by assay of the VWF propeptide in the European study: Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 VWD (MCMDM-1VWD)	Blood	2008	168	Q1	EEUU	0	No especificado
R12	Improving diagnosis of von Willebrand disease: Reference ranges for von Willebrand factor multimer distribution	Research and practice in thrombosis and haemostasis	2020	2	No	Bélgica	0	0
R13	Expression and characterization of von Willebrand factor dimerization defects in different types of von Willebrand disease	Blood	2001	118	Q1	Alemania	0	No especificado

⁴ <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>

⁵ <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>

⁶ www.uniprot.org

⁷ https://grenada.lumc.nl/LOVD2/VWF/home.php?select_db=VWF

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Pruebas de laboratorio convencionales y moleculares empleadas para investigar sobre la EvW

El subcomité norteamericano encargado del estudio del factor de von Willebrand, en 1994 realiza la primera clasificación de la enfermedad basada en pruebas de laboratorio disponibles. Posteriormente, en el año 2006 el ISTH clasifica la EvW en tres grandes grupos; pero, desde los años 70 ya existieron pruebas que buscaron mejorar el diagnóstico de la EvW por ser tan compleja de estudiar y que refleja la heterogeneidad de la estructura de la molécula (Lillicrap & James, 2009; Sadler et al., 2006). Los avances metodológicos han dado pasos agigantados; tanto así que, no tan solo están basados en las características inmunológicas y coagulométricas que no lograron determinar la función de la molécula de la EvW; si no, en las pruebas moleculares y el análisis in silico, mismos que facilitan la búsqueda de ciertas fracciones del ADN para ser amplificadas y así determinar la alteración.

En la Figura 10, se refleja los tipos de pruebas convencionales relacionadas con las pruebas moleculares. El gráfico revela la importancia de las pruebas convencionales utilizadas en todos los artículos seleccionados, como pruebas a realizar primero en el laboratorio para luego, seguir con las pruebas moleculares. No se trata de realizar solo una prueba, sino realizar todas las pruebas posibles para que ayuden a dar claridad al diagnóstico que se emitirá. El FvW:Ag es una de las pruebas convencionales que se realiza con mayor frecuencia y es la primera prueba que indica la cantidad de molécula existente en el paciente; de tal manera, que constituye la primera guía dentro de las pruebas de primer nivel en el laboratorio que informa sobre el estado de la molécula y que está evidenciada (Veyradier et al., 2016b).

El análisis molecular en los casos de EvW tipo 1 en donde la prueba de antígeno debe ser valorado, permite clasificar de mejor manera los fenotipos de los pacientes, en especial los de bajo nivel; luego encontramos FvW:RCo, actividad de FVIII:C, FvW:CB que son las

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

burbujas que más se repiten y que corresponde a la búsqueda que se realiza para detectar un tipo 2.

Llama la atención la prueba de actividad de FVIII que está muy utilizada encontrada en los artículos R01, R02, R05, R07, R010, R012 y R013 y como se conoce estará alterada de manera importante en el grupo 2N, para luego realizar las pruebas moleculares lo que permite su diferenciación con la hemofilia moderada encontrado en artículo 9. El uso de la prueba FvW:FVIII B , encontrada en el artículo R09 no es utilizada con frecuencia en el resto de artículos recopilados, la razón podría ser por problemas de estandarización, falta de control de calidad externo, y baja reproducibilidad con presencia de falsos positivos; podría ser el motivo de no utilizar en gran manera la prueba (Woods et al., 2016).

La presencia de los aloanticuerpos en el estudio de muestras de pacientes es un grave problema que afecta el tratamiento del paciente, encontrado en los artículos R02, R06 y R07; y como prueba correspondiente de tipo inmunológica, existe una falta de estandarización para su identificación en el laboratorio, con variabilidad interlaboratorial (James et al., 2013). Frente a ello, una de las estrategias a seguir es la realización de pruebas moleculares; de esa manera, se conocen las mutaciones más comunes presentes en los aloanticuerpos y se considera como un factor hereditario y de riesgo ante su aparición de tratamiento rápido (Faganel et al., 2020).

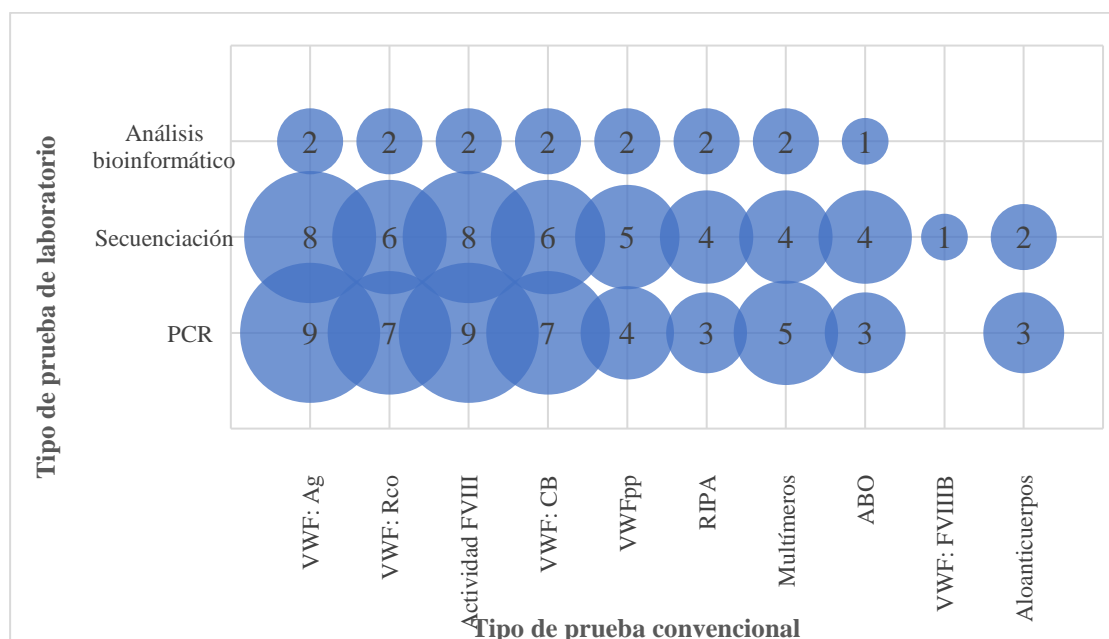
Un factor predisponente que presentan los pacientes con EvW es la presencia del grupo sanguíneo "0", lo que genera una molécula de FvW menor en el 25% en los pacientes con EvW, en comparación con los otros grupos no "0", esto se evaluó en el artículo R01. Estos resultados pueden confundir un verdadero diagnóstico con la EvW, las pruebas moleculares permiten identificar los casos de la enfermedad en donde los valores son significativamente más bajos, lo cual fue encontrado en el artículo R01 (Bellissimo et al., 2012a)

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Desde que Mancuso et al. (1989) realizó la primera caracterización molecular del FvW, se identificó en el gen 52 exones, localizado en 12p13.2; de la misma manera, ha sido descubierto un pseudogen en el cromosoma 22, con características similares a los dominios A1, A2, A3; copia similar a los exones del 23 al 34 con una variación del 3% de la molécula de vW. Por lo tanto, todos los *primers* utilizados en las pruebas moleculares deben estar específicamente diseñados y evitar la amplificación del pseudogen (Baronciani & Peyvandi, 2019; Mancuso et al., 1989). Aunque no todos los laboratorios tienen la disponibilidad de todas las pruebas mencionadas, son las de biología molecular las que son de más difícil adquisición, esto debido al alto costo que representan, aunque son pruebas que dan mucha más claridad en el diagnóstico. El uso de las pruebas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la secuenciación de Sanger y la secuenciación de nueva generación (NGS), fueron encontradas en los artículos R01, R02, R05, R06, R07, R08, R09, R010 y R013. Estas pruebas permiten evaluar las mutaciones en pacientes que no tienen claro su diagnóstico y son útiles para los pacientes identificados fenotípicamente, pero que requieren de un asesoramiento genético, especialmente cuando se requiere un diagnóstico prenatal. Por último, se encontró que también los investigadores utilizan del análisis in silico, encontrado en los artículos R05 y R08, es una herramienta *software* libre para conocer las variaciones genéticas que se pueden presentar, las más comunes, las nuevas o las más raras (Baronciani & Peyvandi, 2019; Lavin et al., 2017; Woods et al., 2017).

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Figura 10. Diagrama de burbujas que relaciona el tipo de prueba de laboratorio con el tipo de prueba convencional



Pruebas de laboratorio convencionales y moleculares en función de los diferentes tipos de la EvW

Con relación a la Figura 12, la EvW es causada por la deficiencia de la cantidad de molécula o su función; por esta razón, es necesario realizar diversas pruebas de laboratorio que han sido clasificadas por niveles de complejidad y ayudan a tipificar fenotípicamente a la EvW.

Después de que el ISTH en el año 2006 realizó la clasificación mencionada en la sección anterior, las pruebas de laboratorio convencionales necesarias para el diagnóstico son utilizadas rutinariamente; mientras que, las pruebas moleculares no lo son. Sin embargo, en algunos casos estas últimas representan una prueba necesaria para una confirmación importante del diagnóstico (Baroncini & Peyvandi, 2020). La clasificación del tipo 2 basada en los defectos funcionales es: 2A, 2B, 2N y 2M; y, el grupo 2A se vuelve a clasificar en 2A/IIA, 2A/IIIE, 2A/IIC, 2A/IID, y todas estas subtipificaciones han sido posibles gracias a las pruebas moleculares que han permitido conocer las mutaciones existentes (Vangenechten & Gadisseur, 2020).

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

En la EvW tipo 1 y 3 generalmente es utilizada la prueba del FvW: Ag, esta es una prueba muy útil para llegar al diagnóstico, cuando los resultados de esta prueba emiten valores disminuidos, se confirma la presencia de esta patología. En los tipos 2, los valores pueden ser normales; por lo tanto, se requieren otros tipos de pruebas funcionales (Favaloro, 2000) En el tipo 2M se puede encontrar resultados normales o disminuidos tras la prueba; mientras que, en el tipo 2N, los niveles se encuentran normales

Existen algunos ensayos que indican la actividad del FvW, por ejemplo, la prueba de Cofactor a la ristocetina FvW: RCo, misma que refleja la unión a la glicoproteína GPIb; esta prueba es útil en el diagnóstico del tipo 1, 2A y 2B; cuyos resultados reflejan una disminución a esta unión. Mientras que, en lo que respecta al tipo 2N, los valores serán normales, y, en el tipo 2M podrán estar normales o disminuidos (Favaloro, 2020).

El FVIII:C, es la prueba que mide la actividad del FVIII plasmático y podrá estar normal o disminuido en todos los casos de la EvW; aunque, siempre estará disminuido en el tipo 3, con valores menores a 10 IU/L. El tipo 2N presenta la cantidad normal de FVIII:C. Pero tiene una capacidad reducida de unirse al FVIII, lo que afecta a la supervivencia del factor en circulación y esa es la razón de que se presente FVIII:C reducido (Baronciani & Peyvandi, 2020).

A pesar de que la prueba de multímeros es considerada como muy útil por Favaloro (2008, 2016, 2020); el autor indica que muchas veces esta prueba compromete un correcto diagnóstico de la enfermedad, generalmente para diferenciar variantes de tipo 1 o del tipo 3. La EvW tipo 3 no muestra distribución de multímeros; además, es importante para diferenciar 2M de 2A y 2B (Woods et al., 2016) . Los tipos 2A y 2B presentan un patrón con pérdida de multímeros lo que se evidencia en hemorragias presente en estos pacientes (Vangenechten & Gadisseur, 2020).

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

La prueba de FvW: CB, va a depender del tamaño de los multímeros; tanto el rendimiento del ensayo, así como la sensibilidad para detectar la enfermedad y clasificación de subtipos, depende de la fuente utilizada de colágeno. Esta prueba junto con el ensayo de FvW: RCo y FvW: Ag permite mejorar la diferenciación tipo 1 del tipo 2A, 2B, 2M (Favaloro et al., 2020). La mutación que afecta al colágeno no siempre se identifica por medio del análisis fenotípico; ya que las mutaciones pueden dañar la unión del tipo I/III de uso más común; mientras que los de tipo IV/VI son empleadas por la comunidad científica para investigación (Goodeve, 2016c).

La agregación plaquetaria inducida por ristocetina (RIPA) permite diferenciar al tipo 2B; usando bajas concentraciones de ristocetina $< 0,6$ mg/mL, a esta concentración baja no se debería producir unión del FvW, ni agregación plaquetaria. En caso de que esto se produzca, da un indicio de que se refiere al tipo 2B o una mutación en el receptor; por tal razón, se utilizan las pruebas moleculares (Favaloro, 2008).

Cuando ninguna de estas pruebas llega a determinar el tipo de EvW, el análisis genético logra ser de gran ayuda mediante la identificación de la mutación. Entre las pruebas más utilizadas siempre fue la PCR y la secuenciación de Sanger, recientemente aparece la secuenciación de próxima generación (NGS) (James & Lillicrap, D 2012) .

Las estrategias de diagnóstico han evolucionado a partir de métodos indirectos basados en análisis de ligamientos con marcadores intra o extragénicos. Tal es el caso de los polimorfismos de un solo nucleótido tándem (STR) o repetición en tándem de número variable (VNTR); y polimorfismos con fragmentos de restricción dirigidos a rastrear el alelo asociado con el defecto molecular causante de la mutación. En cambio, los métodos directos corresponden a un conjunto de técnicas que permiten leer la secuencia de nucleótidos de las regiones de ADN involucrados en la regulación y expresión de la proteína; de esta manera, se

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

diferencia el resultado control y su similar que contendrá una alteración específica; por ello, es considerada como la prueba *gold standard* (Batlle et al., 2019).

Además, es necesario considerar que, en la última década, el método de Sanger ha sido utilizado como un método de referencia debido a su alta sensibilidad y especificidad, a pesar de esto, existen limitaciones en la prueba al ser muy costosa, larga y evalúa secuencias cortas de ADN. Por último, una tercera prueba corresponde a la secuenciación de nueva generación (NGS), esta está basada en la secuenciación simultánea o paralela de miles de amplicones o regiones, lo que permite la caracterización molecular con un alto rendimiento (Batlle et al., 2019).

La detección del grupo EvW tipo 1C con la ayuda de un patrón multimérico, permite evidenciar formas extragrandes entre el 10-15% de la EvW tipo 1. El tipo 2 incluye mutaciones en el dominio A2 (IIA), dominio D3 (IIE), dominio D2 (IIC) y dominio CK (IID) (Vangenechten & Gadisseur, 2020). Con pruebas moleculares se logra detectar el 73% de mutaciones con alteración en la dimerización en la EvW2A; esto se refleja en la disminución o ausencia de los multímeros, ausencia o disminución del RIPA, con disminución o ausencia del FvW: RCo y FvW:CB con normal o ligera disminución del FvW: Ag y el FVIII:C.

El tipo EvW2M presenta el 76% de mutaciones en el dominio A1 con una estructura multimérica normal; sin embargo, el FvW: RCo está disminuido o ausente, mientras que el FvW: Ag y el FVIII:C es normal o levemente disminuido con FvW: CB normal, aunque dependerá del colágeno utilizado.

En el subtipo 2C con pruebas moleculares se revelará mutaciones en el dominio A3, con deficiencia del FvW: CB, FvW: Ag y FvW: RCo y los multímeros resultarán normales.

En la EvW2B, en cambio, se produce mutaciones en el dominio A1, con aumento de afinidad del FvW por la GP1b α , con ausencia de grandes multímeros. El tipo EvW2N, presenta

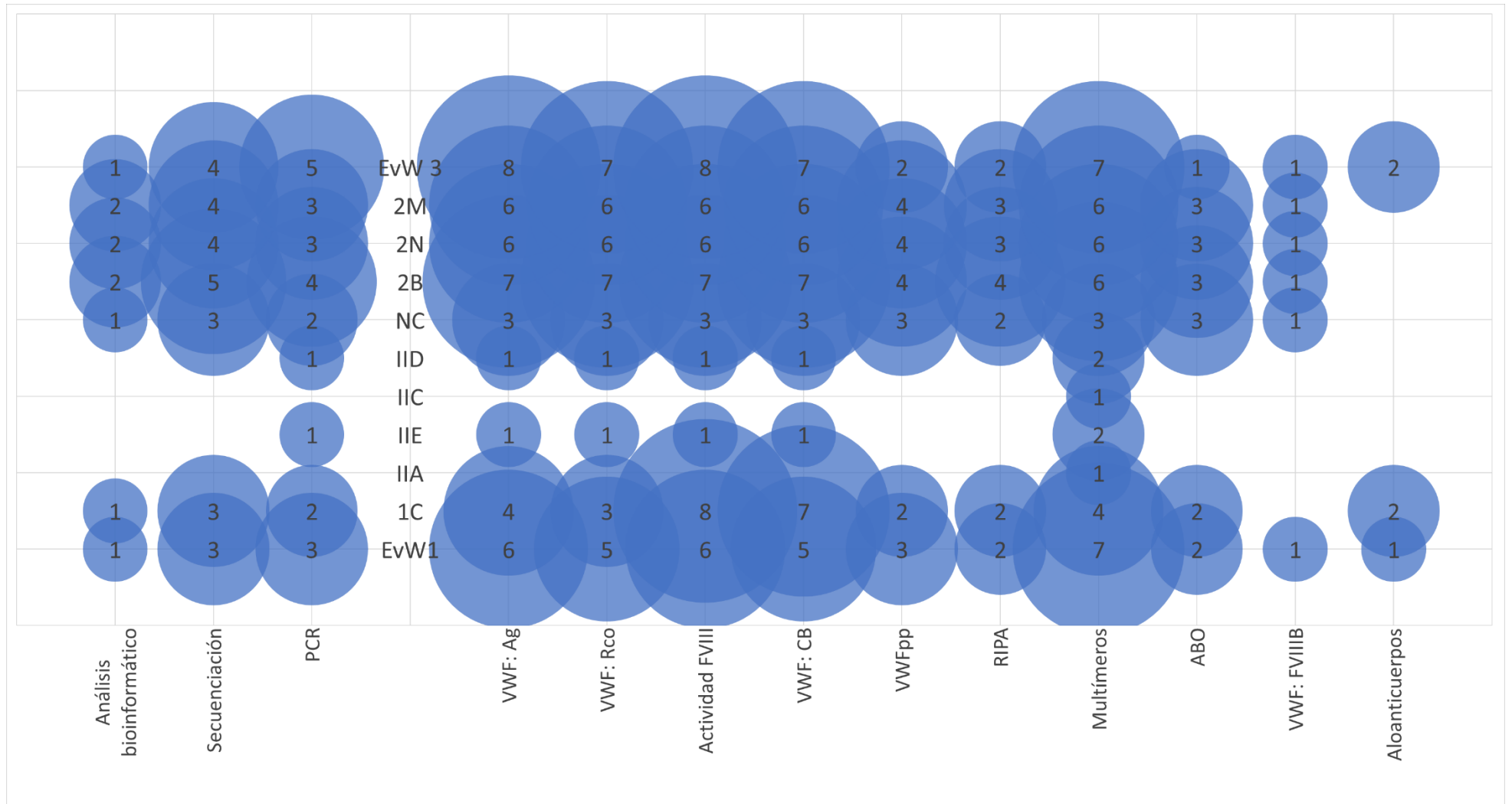
**AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD
DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA**

mutaciones en los dominios D'-D3, con una disminución marcada de FVIII:C, FvW: Ag, FvW: RCo y los multímeros son normales (Goodeve A, 2016c).

Es así que, se evidencia un amplio espectro de pruebas especializadas para la correcta identificación y diagnóstico de los distintos tipos de la EvW.

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Figura 11. Análisis cruzado de los las pruebas de laboratorio para la identificación de los distintos tipos de EvW



AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Síntesis de las pruebas empleadas para el estudio de la EvW

En la Tabla 2 se presenta una síntesis de aquellos estudios que utilizan pruebas convencionales, moleculares o citometría de flujo. Todos los estudios que forman parte de esta revisión sistemática, utilizan pruebas convencionales para sus análisis, tal y como se describió en el apartado anterior. Sin embargo, únicamente R03, R04 y R12 descartan el uso de pruebas moleculares; de estos, el R03 y el R04 corresponden a estudios que siguen la continuación investigaciones previas. El primero (R03) se centra en una reevaluación de la relación entre varios ensayos del FvW y multímeros de FvW, para lo cual utilizan una gama de muestras de EvW, los autores concluyen que los nuevos ensayos automatizados de quimioluminiscencia de actividad de VWF identificaron mejor la pérdida relativa o presencia de HMWM y VHMWM de acuerdo con las relaciones de actividad a Ag y un método de investigación alternativo para identificar VHMWM en pruebas de multímeros para un nuevo método comercial de multímeros puede conducir a menos identificaciones falsas de pérdida de HMW en EvW tipo 1.

En el segundo caso, en el R04, en cambio, el fin del estudio fue evaluar la habilidad de los laboratorios para realizar pruebas de detección de EvW tipo 1 y tipo 3; además, la deficiencia cualitativa del tipo 2. En cambio, en R12, el fin fue establecer un rango de diferencia para H5/11vWM para mejorar la clasificación, concluyendo que El H5/11VWM podría usarse para todos los propósitos clínicos debido a su confiabilidad y su capacidad de diagnóstico rápido y preciso; además de una reducción del sesgo del observador.

Solamente, se registra un estudio (R10) que descarta el uso de pruebas de laboratorio convencionales y moleculares; más bien, los autores optan por el uso de citometría de flujo, el fin de este estudio fue estudiar los genes de 5 miembros de familias con fenotipo PT-EvW.

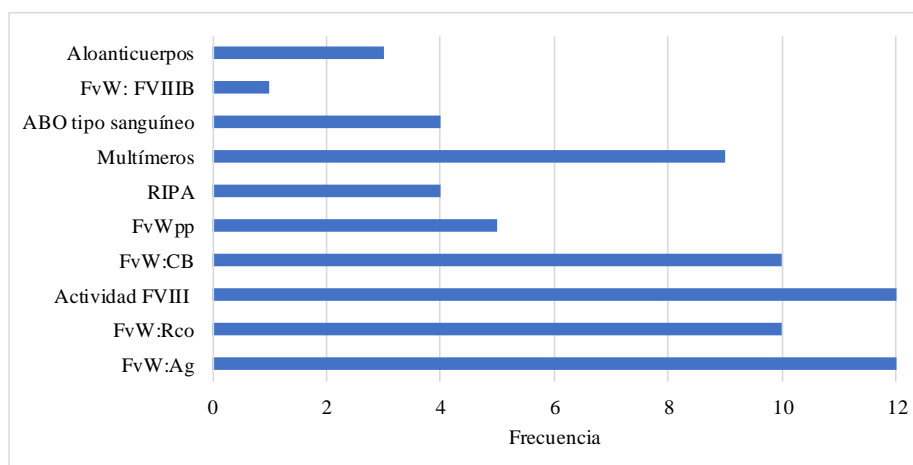
AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Tabla 2. Frecuencia de estudios en la EvW

Pruebas de laboratorio	Frecuencia absoluta (N)	Frecuencia relativa (%)	Artículos
Convencional	13	100	R01, R02, R03, R04, R05, R06, R07, R08, R09, R10, R11, R12, R13
Molecular	10	76,9	R01, R02, R05, R06, R07, R08, R09, R10, R11, R13
Citometría de flujo	1	7,9	R10

En la Figura 13, en cambio, se presenta la frecuencia en la que se han utilizado las diferentes pruebas convencionales; las pruebas predilectas por los investigadores, son la actividad del FVIII y la prueba de Ag; mientras que el FvW: FVIII B se ha empleado en menor medida. Esta última prueba ha sido empleada en R09 en conjunto con una serie de pruebas adicionales para determinar los complejos mecanismos para defectos cuantitativos y cualitativos en la EvW.

Figura 12. Pruebas convencionales



En la Tabla 3, se presenta una síntesis de los tipos de EvW abordados en los diferentes estudios que formaron parte de esta investigación. Particularmente, los artículos R03, R04, R05, R09, R12 y R13; estudian los tres tipos de EvW.

**AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD
DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA**

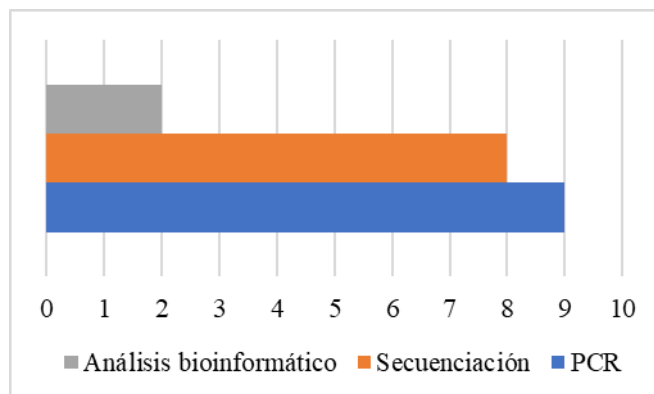
Tabla 3. *Tipos de EvW estudiados en los artículos seleccionados*

Tipos de EvW	Frecuencia (N)	Artículos
EvW 1		
EvW1	7	R03, R04, R05, R09, R11, R12, R13
1C	5	R04, R05, R09, R11, R12
EvW 2		
2A		
IIA	1	R12
IIIE	2	R12, R13
IIC	1	R12
IID	2	R12, R13
Tipo 2A no clasificado	4	R01, R08, R09, R12
2B	8	R01, R03, R04, R05, R08, R09, R10, R12
2N	7	R01, R03, R04, R05, R08, R09, R12
2M	7	R01, R03, R04, R05, R08, R09, R12
EvW3	9	R02, R03, R04, R05, R06, R07, R09, R12, R13

En la Figura 13, se presenta un resumen de la frecuencia de pruebas moleculares que se han utilizado en los estudios seleccionados para este meta-análisis. Únicamente en los estudios R05 y R08, se emplean análisis bioinformáticos combinados con secuenciación y PCR; estos estudios se centran en evaluar y describir los fenotipos, la clínica y la fisiopatología de pacientes con niveles bajos de FvW. En los estudios R01, R02, R06, R10 y R11; en cambio, utilizan como pruebas moleculares la PCR y la secuenciación. Los fines de estos estudios son diversos, pero en general, buscan identificar anticuerpos o la penetración adicional en los polimorfismos y las variaciones de la secuencia.

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Figura 13. Pruebas moleculares



Características metodológicas de los estudios seleccionados

A continuación, se presenta un análisis de resultados desde una perspectiva metodológica. Los estudios han sido llevados a cabo desde diferentes perspectivas metodológicas en función de la naturaleza de los estudios. Para ello se considera la taxonomía propuesta por Parreño (2016); quien señala que los estudios de salud se pueden clasificar según distintas características presentadas en la Figura 14.

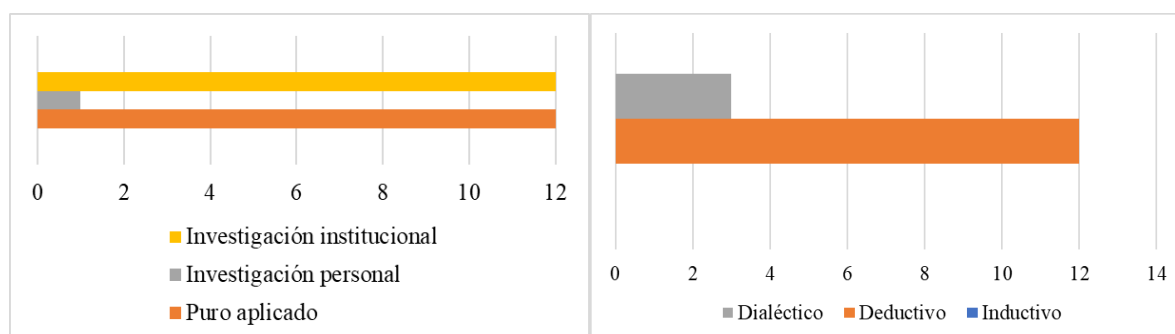
La mayoría de estudios han sido realizados a nivel institucional, los cuales han sido avalados y financiados por centros de investigación como el *National Institute of Health* y el Instituto Científico de Clínica y Traslacional (R01); el *NSW Health Pathology* financió el estudio R03, el *Royal College of Pathologists of Australasia Quality Assurance Program* hizo lo propio con el estudio R04, y el *Irish Board Health Research Award* con el R05. Otras instituciones como el *European Biomed Grant*, la Fundación *Italo Monzino* (R06), la Fundación René Barón y la Academia Nacional de Medicina (Buenos Aires-Argentina) (R08), el Centro de Referencia en la EvW de Francia (R09) y el *Bayer Healthcare Belgium* (R12); también han sido protagonistas en el desarrollo de investigaciones relacionadas con la EvW.

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Según el método de investigación, la mayoría de estudios siguen una lógica deductiva (R01, R02, R05, R06, R07, R08, R09, R11, R12, R13), es decir, parte de hechos generales a particulares. Además, los estudios han sido de carácter primario u observacionales (R01, R02, R03, R09, R10, R12); y, el ambiente de investigación predilecto ha sido el laboratorio.

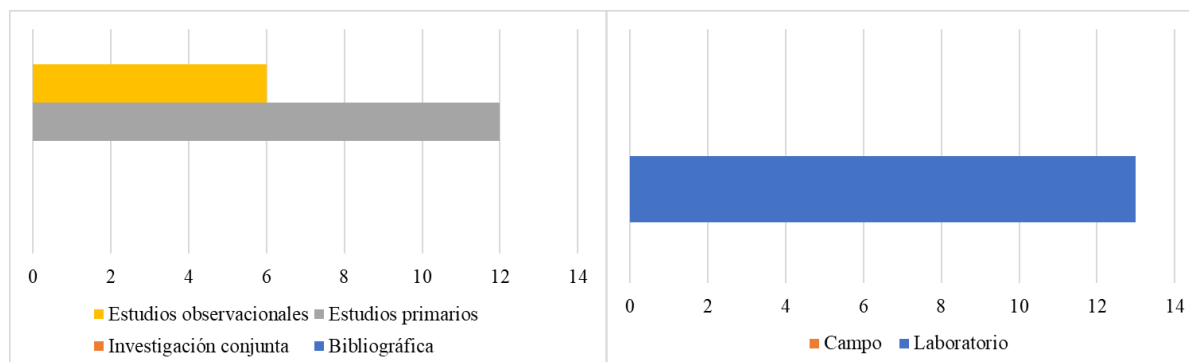
En cuanto a la relación al tiempo y a la secuencia del estudio, la mayoría de estudios son prospectivos y transversales; esto se explica, debido a la naturaleza de la unidad de análisis, muy pocos estudios contaron con bases de datos que permitan hacer estudios retrospectivos (R04) o longitudinales (R04, R05 y R09). Finalmente, los estudios por lo general fueron descriptivos (R01, R02, R03, R04, R08, R11, R12, R13), es decir, se basaron en la estadística descriptiva para reportar sus hallazgos; y analíticos (R05, R06, R07, R08, R09, R10 y R12), donde buscaban la asociación entre dos o más variables.

Figura 14. Clasificación de los hallazgos según el tipo de investigación



(a) Según el propósito

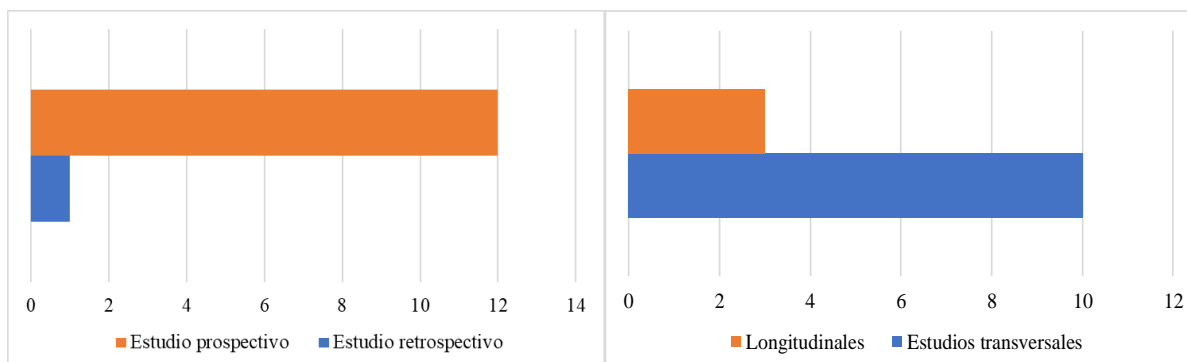
(b) Según el método de investigación



(c) Según las técnicas de investigación

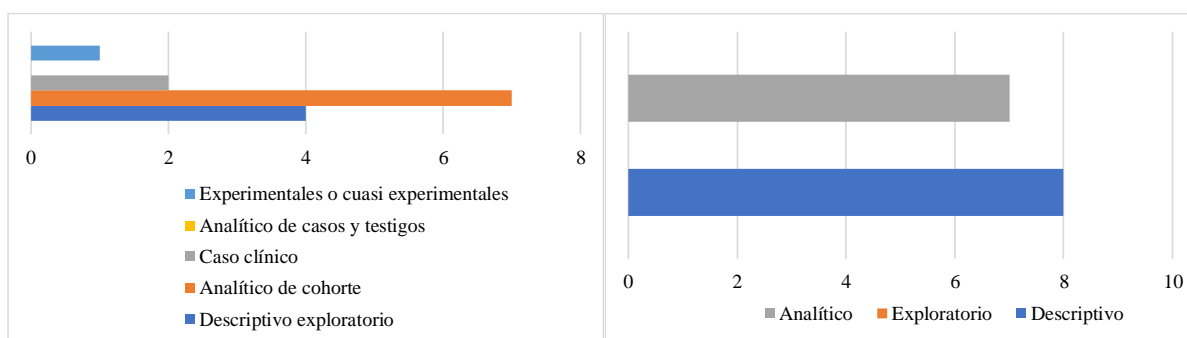
(d) Según el lugar de investigación

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA



(c) Según la relación al tiempo

(d) Según la secuencia del estudio



(e) Según el diseño de investigación

(f) Según el alcance de investigación

Discusión

La presente investigación tuvo como finalidad analizar, por medio de una revisión sistemática, cómo las pruebas de laboratorio convencional y molecular se emplean en el diagnóstico de los diferentes tipos y subtipos de la EvW. De lo que se reporta en la literatura científica, no existe, hasta lo que se conoce un estudio similar que aborde el análisis de las mutaciones de esta enfermedad. Sin embargo, han reportado estudios secundarios que han tenido como fin compilar estudios primarios en función de condiciones o patologías propias de los pacientes con EvW.

Por ejemplo, Makhamreh et al. (2019, 2021) abordan la EvW en mujeres embarazadas e identifican cuáles son las características maternas y las complicaciones obstétricas en mujeres con EvW tipo 2B y tipo 3. Por su parte, Elmaoğulları y Aycan (2018) revisan sobre los diferentes tipos de situaciones en adolescentes que presentan sangrados con diferentes

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

patologías, entre ellos incluye a la EvW. Los estudios realizados por de Jong, Eikenboom (2016), Swami, Kaur (2017), y, Swystun y Lillicrap (2016); son revisiones que solamente actualizan la información médica con los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad y los trastornos resultantes en la hemostasia; emplean pruebas de laboratorio; pero, tienen como limitación que no mencionan los tipos de mutaciones de cada uno de los subtipos de EvW; elemento que sí fue considerado en la investigación actual.

En cambio, James, di Paola (2010); Swystun, James (2019); Tebo et al. (2020); realizan estados del arte relacionados con el diagnóstico molecular de la hemofilia y de la EvW. En el último artículo, los autores analizan las complicaciones cotidianas que atraviesan estos pacientes con trastornos de la coagulación; pero su aporte principal se centra en proporcionar una actualización de los medicamentos requeridos en la patología; descartando, por ende, el análisis de las mutaciones de la EvW.

Otros estudios también han tenido enfoques distintos a la presente investigación; por ejemplo, Ragni et al. (2016) relacionan la EvW con las menorragias presentes en pacientes con dificultades para mantener una calidad de vida normal y se centran en las repercusiones monetarias que implican la atención médica.

Finalmente, autores como Biguzzi et al. (2020), Franchini y Mannucci (2020); Horiuchi et al. (2019) indican en sus revisiones sistemáticas sobre estudios de la EvW adquirida, producida por presencia de anticuerpos y relacionada con diversas patologías; resaltando que la sintomatología puede confundirse con la EvW congénita.

Como se puede evidenciar, no existe una investigación precedente que aborde el análisis de las mutaciones de la EvW en función de las pruebas de laboratorio empleadas; demostrando así la originalidad de este estudio. Si bien cierto, como se mencionó en los párrafos anteriores, la EvW ha sido de gran interés para la comunidad científica. Este documento, brinda a la

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

comunidad científica y a los profesionales de la salud (laboratorio) un insumo que compila los hallazgos relacionados con la vanguardia de las mutaciones de la EvW; abre también, la posibilidad de reconocer la ausencia de investigaciones a nivel nacional y latinoamericano, motivando a quienes nos centramos en el estudio, a nivel molecular, de esta enfermedad a indagar cuáles son las mutaciones que se han presentado en nuestro contexto; de tal forma que se pueda identificar factores de riesgo asociados para promover una cultura de prevención.

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Conclusiones y Recomendaciones

Este estudio tuvo como finalidad realizar una revisión sistemática y un metaanálisis sobre el laboratorio convencional en la EvW y la investigación molecular en los subtipos de esta enfermedad.

Se concluye que las pruebas de laboratorio predilectas por la comunidad científica para investigar sobre la EvW es la FvW:Ag y la de FvW:VIIIc en combinación con las pruebas moleculares (PCR y secuenciación). La prueba de FvW:Ag proporciona cantidad de la molécula; y con ello, se identifican los tipos 1 y 3; en cambio, FvW:VIIIc permite diferenciar un subtipo de la EvW que puede ser confundido con el diagnóstico de hemofilia.

Se concluye, además, que esta enfermedad es altamente heterogénea; por lo que, los estudios moleculares son indispensables para definir diagnósticos inconclusos y las mutaciones de esta enfermedad. Para ello, se ha llevado a cabo estudios netamente en un ambiente de laboratorio, no se ha experimentado; sino, se han realizado estudios descriptivos, analíticos, transversales y, en menor medida, longitudinales; los cuales analizan bases de datos de institutos internacionales que por lo general están ubicados en países desarrollados.

Se recomienda para trabajos futuros, indagar y sistematizar los factores asociados a la EvW como por ejemplo, la etnia, grupos etarios, sexo y tipos de sangrado que presenta el paciente; sin embargo, es necesario resaltar que estas consideraciones no fueron tomadas en cuenta en esta investigación debido al alcance que se propuso en el diseño inicial; ya que el fin fue indagar la relación existente entre los distintos tipos de pruebas de laboratorio, en conjunto con los tipos y subtipos de la EvW. Además, de los hallazgos antes presentados, se observó una brecha de investigación en cuanto al análisis de los aloanticuerpos; por lo que, se recomienda que en futuras investigaciones se amplíen estudios primarios relacionados con esta variable y los distintos tipos y subtipos de la EvW.

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Referencias

- Baronciani, L., Goodeve, A., & Payvandi, F. (2017). Molecular diagnosis of von Willebrand disease. *Haemophilia*, *23*(2), 188–197. <https://doi.org/10.1111/hae.13175>
- Baronciani, L., & Peyvandi, F. (2019). How we make an accurate diagnosis of von Willebrand disease. *Thrombosis Research*, *July*, 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.07.010>
- Baronciani, L., & Peyvandi, F. (2020). How we make an accurate diagnosis of von Willebrand disease. *Thrombosis Research*, *196*(July), 579–589. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.07.010>
- Battle, J., Pérez, A., Corrales, I., Borràs, N., Costa Pinto, J., López, M., & Vidal, F. (2019). Update on Molecular Testing in von Willebrand Disease. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, *45*(7), 708–719. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1679922>
- Bellissimo, D., Christopherson, P., Flood, V., Gill, J., Friedman, K., Haberichter, S., Shapiro, A., Abshire, T., Leissing, C., Lusher, J., Ragni, M., & Montgomery, R. (2012a). VWF mutations and new sequence variations identified in healthy controls are more frequent in the African-American population. *Blood*, *119*(9), 2135–2140. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-384610>
- Bellissimo, D., Christopherson, P., Flood, V., Gill, J., Friedman, K., Haberichter, S., Shapiro, A., Abshire, T., Leissing, C., Lusher, J., Ragni, M., & Montgomery, R. (2012b). VWF mutations and new sequence variations identified in healthy controls are more frequent in the African-American population. *Blood*, *119*(9), 2135–2140. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-384610>

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

- Bellissimo, D., Christopherson, P., Flood, V., Gill, J., Friedman, K., Haberichter, S., Shapiro, A., Abshire, T., Leissing, C., Lusher, J., Ragni, M., & Montgomery, R. (2012c). VWF mutations and new sequence variations identified in healthy controls are more frequent in the African-American population. *Blood*, *119*(9), 2135–2140. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-384610>
- Berber, E. (2012). The molecular genetics of von Willebrand disease. *Turkish Journal of Hematology*, *29*(4), 313–324. <https://doi.org/10.5505/tjh.2012.39205>
- Biblioteca Universitaria Unibersitateko Liburutegia. (2021). *Cuartiles - Índices de impacto*. Biblioguías LibGidak.
<https://biblioguias.biblioteca.deusto.es/c.php?g=155487&p=1114311>
- Biguzzi, E., Siboni, S. M., & Peyvandi, F. (2020). *How I treat gastrointestinal bleeding in congenital and acquired von Willebrand disease*. www.clinicaltrials.gov
- Bowman, M. L., Pluthero, F. G., Tuttle, A., Casey, L., Li, L., Christensen, H., Robinson, K. S., Lillicrap, D., Kahr, W. H. A., & James, P. (2017). Discrepant platelet and plasma von Willebrand factor in von Willebrand disease patients with p.Pro2808Leufs*24. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. <https://doi.org/10.1111/jth.13722>
- Castaman, G., Hillarp, A., & Goodeve, A. (2014). Laboratory aspects of von Willebrand disease: Test repertoire and options for activity assays and genetic analysis. *Haemophilia*, *20*(S4), 65–70. <https://doi.org/10.1111/hae.12410>
- de Faria, F., Henneberg, R., do Nascimento, A., Kubo, K., Frigeri, H., & da Silva, P. (2016). Von Willebrand Disease Lab Diagnosis. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, *32*(2), 135–140. <https://doi.org/10.1007/s12288-015-0627-x>

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

- de Jong, A., & Eikenboom, J. (2016). Developments in the diagnostic procedures for von Willebrand disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 14(3), 449–460. <https://doi.org/10.1111/jth.13243>
- Di Paola Lab. (2021). *Von Willebrand Factor & Von Willebrand Disease*. Department of Pediatrics. Hematology & Oncology. <https://dipaolalab.wustl.edu/research/von-willebrand-disease/>
- Elmaoğulları, S., & Aycan, Z. (2018). Abnormal uterine bleeding in adolescents. In *JCRPE Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology* (Vol. 10, Issue 3, pp. 191–197). Galenos Yayincilik,. <https://doi.org/10.4274/jcrpe.0014>
- Faganel, B., Strandberg, K., Debeljak, M., Kitanovski, L., Jazbec, J., Benedik-Dolničar, M., & LastNameTrampuš, A. (2020). von Willebrand factor alloantibodies in type 3 von Willebrand disease. *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis*, 31(1), 77–79. <https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000000865>
- Favaloro, E. (2008). Phenotypic identification of platelet-type von Willebrand disease and its discrimination from type 2B von Willebrand disease: A question of 2B or not 2B? A story of nonidentical twins? Or two sides of a multidenominational or multifaceted primary-hemostas. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 34(1), 113–127. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1066019>
- Favaloro, E. (2011). Rethinking the diagnosis of von Willebrand disease. *Thrombosis Research*, 127(SUPPL. 2), S17–S21. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(10\)70149-3](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(10)70149-3)
- Favaloro, E. J. (2000). Coagulation and Transfusion Medicine / DETECTION OF QUALITATIVE Detection of von Willebrand Disorder and Identification of Qualitative von Willebrand Factor Defects Direct Comparison of Commercial ELISA-Based von

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Willebrand Factor Activity Options. In *Am J Clin Pathol* (Vol. 114).
<http://ajcp.oxfordjournals.org/>

Favaloro, E. J. (2008). Phenotypic identification of platelet-type von Willebrand disease and its discrimination from type 2B von Willebrand disease: A question of 2B or not 2B? A story of nonidentical twins? Or two sides of a multidimensional or multifaceted primary-hemostas. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 34(1), 113–127.
<https://doi.org/10.1055/s-2008-1066019>

Favaloro, E. J. (2020). Classification of von Willebrand disease in the context of modern contemporary von Willebrand factor testing methodologies. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 4(6), 952–957. <https://doi.org/10.1002/rth2.12392>

Favaloro, E. J., Bodó, I., Israels, S. J., & Brown, S. A. (2014). von Willebrand disease and platelet disorders. In *Haemophilia* (Vol. 20, Issue S4). <https://doi.org/10.1111/hae.12414>

Favaloro, E. J., Oliver, S., Mohammed, S., & Vong, R. (2020). Comparative assessment of von Willebrand factor multimers vs activity for von Willebrand disease using modern contemporary methodologies. *Haemophilia*, 26(3), 503–512.
<https://doi.org/10.1111/hae.13957>

Favaloro, E., Pasalic, L., & Curnow, J. (2016). Laboratory tests used to help diagnose von Willebrand disease: an update. *Pathology*, 48(4), 303–318.
<https://doi.org/10.1016/j.pathol.2016.03.001>

Federici, A. B. (2014). Clinical and laboratory diagnosis of VWD. *Hematology*, 2014(1), 524–530. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2014.1.524>

Flood, V. H. (2014). New insights into genotype and phenotype of VWD. *Hematology*, 2014(1), 531–535. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2014.1.531>

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Franchini, M., & Mannucci, P. M. (2020). Acquired von Willebrand syndrome: Focused for hematologists. In *Haematologica* (Vol. 105, Issue 8, pp. 2032–2037). Ferrata Storti Foundation. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.255117>

François Lanza Université Louis Pasteur. (2014, February 17). *Platelet glycoprotein Ib-V-IX complex*. Journal of Conservative Dentistry. https://www.jcd.org.in/viewimage.asp?img=JConservDent_2014_17_2_188_128044_f2.jpg

Furlan, M. (1996). Von Willebrand factor: Molecular size and functional activity. *Annals of Hematology*, 72(6), 341–348. <https://doi.org/10.1007/s002770050184>

Goodeve, A. (2016). Diagnosing von Willebrand disease: Genetic analysis. *Hematology*, 1(1), 678–682. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.678>

Haberichter, S. L., Castaman, G., Budde, U., Peake, I., Goodeve, A., Rodeghiero, F., Federici, A. B., Batlle, J., Meyer, D., Mazurier, C., Goudemand, J., Eikenboom, J., Schneppenheim, R., Ingerslev, J., Vorlova, Z., Habart, D., Holmberg, L., Lethagen, S., Pasi, J., ... Montgomery, R. R. (2008a). Identification of type 1 von Willebrand disease patients with reduced von Willebrand factor survival by assay of the VWF propeptide in the european study: Molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 VWD (MCMDM-1VWD). *Blood*, 111(10), 4979–4985. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-110940>

Horiuchi, H., Doman, T., Kokame, K., Saiki, Y., & Matsumoto, M. (2019). Acquired von willebrand syndrome associated with cardiovascular diseases. In *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* (Vol. 26, Issue 4, pp. 303–314). Japan Atherosclerosis Society. <https://doi.org/10.5551/jat.RV17031>

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

- James, A., Eikenboom, J., & Federici, A. (2016). State of the art: von Willebrand disease. *Haemophilia*, 22, 54–59. <https://doi.org/10.1111/hae.12984>
- James, P., Connell, N., Ameer, B., Di Paola, J., Eikenboom, J., Giraud, N., Haberichter, S., Jacobs-Pratt, V., Konkle, B., McLintock, C., McRae, S., Montgomery, R., O'Donnell, J., Scappe, N., Sidonio, R., Flood, V., Husainat, N., Kalot, M., & Mustafa, R. (2021a). ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease. In *Blood Advances* (Vol. 5, Issue 1). <https://doi.org/10.1182/BLOODADVANCES.2020003265>
- James, P., Connell, N., Ameer, B., Di Paola, J., Eikenboom, J., Giraud, N., Haberichter, S., Jacobs-Pratt, V., Konkle, B., McLintock, C., McRae, S., Montgomery, R., O'Donnell, J., Scappe, N., Sidonio, R., Flood, V., Husainat, N., Kalot, M., & Mustafa, R. (2021b). ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease. In *Blood Advances* (Vol. 5, Issue 1). <https://doi.org/10.1182/BLOODADVANCES.2020003265>
- James, P., Connell, N., Ameer, B., Di Paola, J., Eikenboom, J., Giraud, N., Haberichter, S., Jacobs-Pratt, V., Konkle, B., McLintock, C., McRae, S., Montgomery, R., O'Donnell, J., Scappe, N., Sidonio, R., Flood, V., Husainat, N., Kalot, M., & Mustafa, R. (2021c). ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease. In *Blood Advances* (Vol. 5, Issue 1). <https://doi.org/10.1182/BLOODADVANCES.2020003265>
- James, P., & di Paola, J. (2010). *The application of genetics to inherited bleeding disorders*. <http://www.vwf.group.shef.ac.uk>
- James, P. D., & Lillicrap, D. (2012). von Willebrand disease: Clinical and laboratory lessons learned from the large von Willebrand disease studies. *American Journal of Hematology*, 87(SUPPL. 1), 1–22. <https://doi.org/10.1002/ajh.23142>
- James, P. D., Lillicrap, D., & Mannucci, P. M. (2013). *Review Article Alloantibodies in von Willebrand disease*. <https://doi.org/10.1182/blood-2012>

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

- James, P., & Lillicrap, D. (2012). von Willebrand disease: Clinical and laboratory lessons learned from the large von Willebrand disease studies. *American Journal of Hematology*, 87(SUPPL. 1), 1–22. <https://doi.org/10.1002/ajh.23142>
- James, P., Lillicrap, D., & Mannucci, P. (2013). Alloantibodies in von Willebrand disease. *Blood*, 122(5), 636–640. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-462085>
- Kitchenham. (2004a). Service function chaining across openstack and kubernetes domains. *DEBS 2019 - Proceedings of the 13th ACM International Conference on Distributed and Event-Based Systems*, 240–243. <https://doi.org/10.1145/3328905.3332505>
- Kitchenham, B. (2004b). Procedures for Performing Systematic Reviews. *Keele, UK, Keele Univ.*, 33.
- Lavin, M., Aguila, S., Schneppenheim, S., Dalton, N., Jones, K. L., O’Sullivan, J. M., O’Connell, N. M., Ryan, K., White, B., Byrne, M., Rafferty, M., Doyle, M. M., Nolan, M., Preston, R. J. S., Budde, U., James, P., di Paola, J., & O’Donnell, J. S. (2017). Novel insights into the clinical phenotype and pathophysiology underlying low VWF levels. *Blood*, 130(21), 2344–2353. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-05-786699>
- Lillicrap, D. (2008). Ciencia básica, diagnóstico y tratamiento médico de la Enfermedad de von Willebrand. *Wfh*, 35, 1–13.
- Lillicrap, D., & James, P. (2009). Tratamiento de la hemofilia enfermedad de von willebrand: introducción para médicos de atención primaria. *Tratamiento de La Hemofilia*, 47, 1–149. <http://www1.wfh.org/publication/files/pdf-1205.pdf>
- Makhamreh, M. M., Kass, S. L., Russo, M. L., Ahmadzia, H., & Al-Kouatly, H. B. (2019). Type 3 von Willebrand Disease in Pregnancy: A Systematic Literature Review. In

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

American Journal of Perinatology (Vol. 38, Issue 5, pp. 436–448). Thieme Medical Publishers, Inc. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1700541>

Makhamreh, M. M., Russo, M. L., Karl, T., Delgado, N., Lackritz, K., Skupski, D. W., & Al-Kouatly, H. B. (2021). Type 2B von Willebrand Disease in Pregnancy: A Systematic Literature Review. In *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* (Vol. 47, Issue 2, pp. 201–216). Thieme Medical Publishers, Inc. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1723799>

Mancuso, D., Tuley, E., Westfield, L., Worrall, N., Shelton-Inloes, B., Sorace, J., Alevy, Y., & Sadlers, J. (1989). Structure of the Gene for Human von Willebrand Factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(33), 19514–19527. <https://n9.cl/cvtgn>

Mazurier, C., Goudemand, J., Hilbert, L., Caron, C., Fressinaud, E., & Meyer, D. (2001). Type 2N von Willebrand disease: Clinical manifestations, pathophysiology, laboratory diagnosis and molecular biology. *Best Practice and Research: Clinical Haematology*, 14(2), 337–347. <https://doi.org/10.1053/beha.2001.0138>

Ng, C., & Di Paola, J. (2018). von Willebrand Disease: Diagnostic Strategies and Treatment Options. *Pediatric Clinics of North America*, 65(3), 527–541. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2018.02.004>

Page, M. J., McKenzie, J. E., Bossuyt, P. M., Boutron, I., Hoffmann, T. C., Mulrow, C. D., Shamseer, L., Tetzlaff, J. M., Akl, E. A., Brennan, S. E., Chou, R., Glanville, J., Grimshaw, J. M., Hróbjartsson, A., Lalu, M. M., Li, T., Loder, E. W., Mayo-Wilson, E., McDonald, S., ... Moher, D. (2021a). The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. In *The BMJ* (Vol. 372). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>

Page, M. J., McKenzie, J. E., Bossuyt, P. M., Boutron, I., Hoffmann, T. C., Mulrow, C. D., Shamseer, L., Tetzlaff, J. M., Akl, E. A., Brennan, S. E., Chou, R., Glanville, J., Grimshaw,

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

- J. M., Hróbjartsson, A., Lalu, M. M., Li, T., Loder, E. W., Mayo-Wilson, E., McDonald, S., ... Moher, D. (2021b). The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. In *The BMJ* (Vol. 372). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>
- Parreño, A. (2016). *Metodología de investigación en salud*. Escuela Superior Politécnica Chimborazo. <https://docer.com.ar/doc/xxcx18c>
- Ragni, M. v., Machin, N., Malec, L. M., James, A. H., Kessler, C. M., Konkle, B. A., Kouides, P. A., Neff, A. T., Philipp, C. S., & Brambilla, D. J. (2016). Von Willebrand factor for menorrhagia: A survey and literature review. *Haemophilia*, 22(3), 397–402. <https://doi.org/10.1111/hae.12898>
- Roberts, J. C., & Flood, V. H. (2015). Laboratory diagnosis of von Willebrand disease. *International Journal of Laboratory Hematology*, 37(S1), 11–17. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12345>
- Sadler, J. E., Budde, U., Eikenboom, J. C. J., Favaloro, E. J., Hill, F. G. H., Holmberg, L., Ingerslev, J., Lee, C. A., Lillicrap, D., Mannucci, P. M., Mazurier, C., Meyer, D., Nichols, W. L., Nishino, M., Peake, I. R., Rodeghiero, F., Schneppenheim, R., Ruggeri, Z. M., Srivastava, A., ... Federici, A. B. (2006). Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: A report of the Subcommittee on von Willebrand factor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4(10), 2103–2114. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.02146.x>
- Schneppenheim, R., & Budde, U. (2011). von Willebrand factor: The complex molecular genetics of a multidomain and multifunctional protein. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9(1 S), 209–215. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04324.x>

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

- Stockschlaeder, M., Schneppenheim, R., & Budde, U. (2014). Update on von Willebrand factor multimers: Focus on high-molecular-weight multimers and their role in hemostasis. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 25(3), 206–216. <https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000000065>
- Stufano, F., Baronciani, L., & Peyvandi, F. (2017). DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. *Diagnóstico de La EVW. Caracterización Fenotípica*, 55.
- Swami, A., & Kaur, V. (2017). Von Willebrand Disease: A Concise Review and Update for the Practicing Physician. In *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* (Vol. 23, Issue 8, pp. 900–910). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/1076029616675969>
- Swystun, L. L., & James, P. (n.d.). *Using genetic diagnostics in hemophilia and von Willebrand disease The role of genetic testing for hemophilia A and B*. <http://ashpublications.org/hematology/article-pdf/2015/1/152/1249549/bep00115000152.pdf>
- Swystun, L. L., & James, P. D. (2017a). Genetic diagnosis in hemophilia and von Willebrand disease. In *Blood Reviews* (Vol. 31, Issue 1). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2016.08.003>
- Swystun, L. L., & James, P. D. (2017b). Genetic diagnosis in hemophilia and von Willebrand disease. In *Blood Reviews* (Vol. 31, Issue 1). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2016.08.003>
- Swystun, L. L., & Lillicrap, D. (2016). How much do we really know about von Willebrand disease? In *Current Opinion in Hematology* (Vol. 23, Issue 5, pp. 471–478). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000272>

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

- Tebo, C., Gibson, C., & Mazer-Amirshahi, M. (2020). Hemophilia and von Willebrand Disease: A Review of Emergency Department Management. *Journal of Emergency Medicine*, 58(5), 756–766. <https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2020.02.019>
- Vangenechten, I., & Gadisseur, A. (2020). Improving diagnosis of von Willebrand disease: Reference ranges for von Willebrand factor multimer distribution. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 4(6), 1024–1034. <https://doi.org/10.1002/rth2.12408>
- Veyradier, A., Boisseau, P., Fressinaud, E., Caron, C., Ternisien, C., Giraud, M., Zawadzki, C., Trossaert, M., Itzhar-Baïkian, N., Dreyfus, M., D’Oiron, R., Borel-Derlon, A., Susen, S., Bezieau, S., Denis, C. V., & Goudemand, J. (2016a). A laboratory phenotype/genotype correlation of 1167 French patients from 670 families with von willebrand disease: A new epidemiologic picture. *Medicine (United States)*, 95(11), 1–11. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003038>
- Veyradier, A., Boisseau, P., Fressinaud, E., Caron, C., Ternisien, C., Giraud, M., Zawadzki, C., Trossaert, M., Itzhar-Baïkian, N., Dreyfus, M., D’Oiron, R., Borel-Derlon, A., Susen, S., Bezieau, S., Denis, C. v., & Goudemand, J. (2016b). A laboratory phenotype/genotype correlation of 1167 French patients from 670 families with von willebrand disease: A new epidemiologic picture. *Medicine (United States)*, 95(11), 1–11. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003038>
- Woods, A., Ac, K., Paiva J, A, S.-L., & Ma, L. (2016). *Función plaquetaria y diagnóstico de enfermedad de von Willebrand. Platelet function tests and von Willebrand disease diagnosis Biología molecular en la enfermedad de von Willebrand. Estado actual y perspectivas Molecular biology in von Willebrand disease.* 164–173.

AVANCES MOLECULARES EN LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Woods, A., Blanco, A., Kempfer, A., Paiva, J., Bermejo, E., Luceros, A., & Lazzari, M. (2016).

Factor von Willebrand y Enfermedad de von Willebrand: nuevos enfoques diagnósticos.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 50(2), 273–289.

Woods, A. I., Blanco, A. N., Kempfer, A. C., Paiva, J., Bermejo, E. I., Luceros, A. S., & Lazzari,

M. A. (2016). Factor von Willebrand y Enfermedad de von Willebrand: nuevos enfoques

diagnósticos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 50(2), 273–289.

Woods, A. I., Kempfer, A. C., Paiva, J., Sanchez-Luceros, A., Bermejo, E., Chuit, R., Alberto,

M. F., Blanco, A. N., & Lazzari, M. A. (2017). Phenotypic Parameters in Genotypically

Selected Type 2B von Willebrand Disease Patients: A Large, Single-Center Experience

Including a New Novel Mutation. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 43(1), 092–

100. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1597293>