


Aplicació de tecnologies optimitzades al diagnòstic molecular de la malaltia de von Willebrand per a l'estudi de la relació genotip-fenotip

Irene Corrales Insa

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

A microscopic image showing a red blood cell (erythrocyte) and a white blood cell (leucocyte). The red blood cell is large and biconcave, with a reddish-orange hue. The white blood cell is smaller and more irregular in shape, with a lighter, more granular appearance. The background is a textured, reddish-pink color, likely representing the surrounding tissue or fluid.

Aplicació de tecnologies optimitzades
al diagnòstic molecular de la malaltia
de von Willebrand per a l'estudi de la
relació genotip – fenotip.

Irene Corrales Insa

Aplicació de tecnologies optimitzades al diagnòstic
molecular de la malaltia de von Willebrand per a
l'estudi de la relació genotip-fenotip.

Memòria presentada per:

Irene Corrales Insa

Per optar al grau de:

Doctor per la Universitat de Barcelona

Bienni 2006-2008

Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció del Dr. Francisco Vidal Pérez, a la Unitat de Diagnòstic i Teràpia Molecular del Banc de Sang i Teixits i sota la supervisió del Dr. Bru Cormand i Rifà del Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona

Irene Corrales Insa

Barcelona 2010

EL DIRECTOR DE TESI

Dr. Francisco Vidal Pérez

Unitat de Diagnòstic i Teràpia Molecular



EL TUTOR DE TESI

Dr. Bru Cormand Rifà

Departament de Genètica



“Les lleis de l’herència són un fenomen meravellós
que ens exigeix de la responsabilitat
de les nostres deficiències”

Doug Larson



Als meus avis, Paco i Domi
Als meus pares, Dídac i Mar
Al meu germà, Marc

A l'Eloi

Agraïments



Avui sóc jo qui opta al títol de doctor, però se'n mereixen un totes i cadascuna de les persones que conviuen amb tu mentre prepares la tesi. Hi hauria uns quants doctors en paciència, doctors en comprensió, doctors en horaris estranys, doctors en mals de panxa i doctors en “es que no ens veiem” repartits pel món. Per això vull agrair a tots aquests doctors i a d'altres, el munt d'experiències que he viscut durant aquests anys.

Al doctor Francisco Vidal, el meu director de tesi, per apostar per mi sense més, per creure en la meva il·lusió i les meves ganes de treballar, per formar-me i confiar que faria la feina ben feta. Per la teva complicitat i proximitat. Perquè fa només quatre anys que vaig entrar al teu despatx: “Fran, tengo que hablar contigo..... es que estoy leyendo los artículos que me pasaste y NO ENTIENDO NADA!!”. A ell i a tots els membres de l'equip de la Unitat de Diagnòstic i Teràpia Molecular. A la Lorena Ramírez, a tu et dec tot allò que es fa davant d'una “poyata”. Has estat mestra, companya infatigable i amiga (i la música del teu mòbil forma part de la banda sonora d'aquesta tesi!). Al doctor Lluís Martorell, company lleial de dinars al menjador y cafès a mitja tarda. Les teves cançons i jocs de paraules han amenitzat el laboratori i m'han fet riure més d'una vegada (Albarán más de mil años, muchos maaaas..... 🎵🎵).

Als doctors Rafael Parra, Carme Altisent i Júlia Ayats i a tota la Unitat d'Hemofília que són la part clínica d'aquesta recerca, pel seu diari cara a cara amb els pacients i per ser la font d'informació necessària per completar aquest treball.

AGRAÏMENTS

Als doctors Jordi Barquiner (font del vocabulari més divers) i Ramón Gimeno (per tantes converses a mitja tarda), companys des de l'experiència i víctimes dels meus dubtes i la meua curiositat sobre els temes més diversos.

A les "nenes" per ser-hi, per acompanyar-me i patir plegades la meua i les seves tesis: Herena, per ser la primera i fer-nos de model i exemple (Visca el Barça!); Alba, per la teua predisposició i empatia (i pels caps de setmana al laboratori!); Sonia, per tu sinceridad y honestidad (y por el "buenos días" de los lunes por la mañana!); Rebeca, por tu energía inagotable y tu ilusión por las cosas (y las galletas de tu madre!); Melanie, por tu locura y tu risa (y tus traducciones desconcertantes).

Al meu tutor de tesi, el doctor Bru Cormand, per la seva predisposició i proximitat i pels dubtes resolts pel gmail de forma immediata.

I als meus:

Als meus amics, als qui, per temps que passi, per poc que els vegi i per lluny que marxi, sé que hi són i que sempre els tinc al meu costat.

Als meus pares, Dídac i Mar, orgullosos del meu treball alhora que crítics, a vosaltres us ho dec tot i a vosaltres us la dedico especialment, per que aquest no és més que un altre fruit del vostre esforç. Al meu germà Marc, per la teua complicitat i el teu suport incondicional, i a la Cris, de nena d'esplai a cunyada i companya de doctorat. Al meu avi Paco, que avui se sentiria encara més orgullós del seu "gitanot" i a la iaia Domi, model de força i tendresa que sempre m'ha acompanyat.

A tu, Eloi, perquè tot al teu costat és senzill, per que sempre trobes el costat bo de les coses, per que tens cura de mi, per que t'estimo. A tu i a la teua família, que m'han acceptat com una més i també d'ells he rebut les forces i els ànims per seguir endavant.



Casa de la família Sundblom a la illa de Föglö

Hjördis Sundblom, 5 years.

Admitted on 29th April, 1924. Born at term. For birth somewhat feeble. Was nursed for 8 months. Always fidgety and nervous. During the present year she has become stronger, but is still fery fidgety. Between age 1 and 2 she had measles. No other diseases of childhood. Walked at the age of one and began to talk at the usual time. She is receptive. At the age of one, her bleeding tendency was observed when she fell and hurt her nose and bled for an unusually long time. At 3 years, she fell and had a deep cut in the upper lip. Bled heavily for 3 days and became bloodless and almost unconscious. Had to lie in bed for 10 weeks, and the recovered fairly swiftly. After this, she has bled several times, mostly from her nose or gingivæ, but she also has had frequent bruising. She once distorted a foot and had a big bleeding into the joint with intense pain for some weeks. Skeleton and musculature normally developed. State of nutrition medium. Skin somewhat pale. On face, arms and legs some bruises of varying size, mostly $\frac{1}{2}$ to 2 cm. in diameter. Looks fairly healthy. No lymph node swelling. Nothing to note from other organs [Von Willebrand 1926].

Fragment de l'article original publicat el 1926 per Erik von Willebrand al *Finska Läkaresällskapets Handlingar* "Hereditär pseudohemofili".



Índex

No os preocupéis demasiado esta noche pensando en el camino. Pues los caminos que seguiréis todos vosotros ya se extienden quizás a vuestros pies, aunque no los veáis aún.

La comunidad del anillo
J.R.R. Tolkien

Índex



ABREVIACIONS	17
INTRODUCCIÓ	21
1. HISTÒRIA DE LA MALALTIA DE VON WILLEBRAND.....	21
2. CLÍNICA DE LA MALALTIA DE VON WILLEBRAND	24
2.1 Epidemiologia	24
2.2 Diagnòstic.....	25
2.2.1 Manifestacions clíniques	25
2.2.2 Història familiar.....	26
2.2.3 Proves de laboratori	26
2.3 Classificació.....	28
2.3.1 Dèficits quantitatus	29
▪ Tipus 1.....	29
▪ Tipus 3.....	30
2.3.2 Dèficits qualitatus	30
▪ Tipus 2A.	30
▪ Tipus 2B.	31
▪ Tipus 2M.....	32

ÍNDEX

▪ Tipus 2N.....	32
2.4 Prevenció i tractament.....	33
2.4.1 Teràpies coadjuvants	33
2.4.2 Teràpies que incrementen les concentracions de factor de coagulació	34
▪ Desmopressina o DDAVP	34
▪ Concentrats de VWF/FVIII.....	35
2.4.3 El futur en el tractament de la VWD	35
3. BASES MOLECULARS DE LA MALALTIA DE VON WILLEBRAND.....	36
3.1 Proteïna VWF	36
3.2 Funció del VWF a l'hemostàsia	38
3.2.1 Hemostàsia primària.....	39
3.2.2 Hemostàsia secundària	40
3.3 El VWF i el VWFP.....	41
4. DIAGNÒSTIC MOLECULAR DE LA MALALTIA DE VON WILLEBRAND	42
4.1 Dificultats diagnòstiques	42
4.2 Tècniques de diagnòstic	42
4.2.1 Diagnòstic indirecte	42
4.2.2 Diagnòstic directe	45
▪ Cribatge de mutacions.....	45
▪ Seqüenciació directa.....	46
4.3 Estratègies de seqüenciació.....	47
4.3.1 Seqüenciació tradicional.....	47
4.3.2 Noves plataformes de seqüenciació massiva.....	47
▪ Roche/454 FLX.....	48
▪ Illumina/Solexa Genome Analyzer.....	49
▪ Applied Biosystems SOLiD System.....	50
5. MUTACIONS AL VWF.....	51
▪ Transcripcionals.....	51
▪ Canvi de sentit.....	52
▪ Sense sentit	52

▪ Petites delecions, insercions o duplicacions	52
▪ Grans delecions.....	52
▪ Conversió gènica	52
▪ En potencials llocs d' <i>splicing</i> (PSSM).....	53
5.1 Estudis per identificar l'efecte de les mutacions.....	54
5.1.1 Anàlisi in silico	54
5.1.2 Anàlisi in vivo	55
5.1.3 Anàlisi in vitro	56
5.2 Registres de mutacions	56
5.2.1 ISTH-SSC VWF online database	57
5.3 Contribució dels estudis multicèntrics a l'epidemiologia molecular de la VWD	58
5.3.1 VWD tipus 1	58
5.3.2 VWD tipus 2	59
5.3.3 VWD tipus 3	60
OBJECTIUS	63
RESULTATS	67
ARTICLE 1: <i>Rapid molecular diagnosis of von Willebrand disease by direct sequencing.</i> <i>Detection of 12 novel putative mutations in VWF gene.</i>	67
ARTICLE 2: <i>Integration of molecular and clinical data of 40 unrelated VWD families in a</i> <i>Spanish locus-specific mutation database. First release including 58 mutations.</i> ..	79
ARTICLE 3: <i>Study of the effect of splicing mutations in the VWF gene using RNA isolated</i> <i>from patient's platelets and leukocytes.</i>	85
ARTICLE 4: <i>Next generation sequencing approaches for the molecular diagnosis of von</i> <i>Willebrand disease</i>	105
INFORME DEL DIRECTOR.....	129
DISCUSSIÓ	135

ÍNDEX

1. DIFICULTATS DIAGNÒSTIQUES	137
1.1 Diagnòstic clínic.....	137
1.2 Diagnòstic molecular	138
2. TÈCNiques APLICADES AL DIAGNÒSTIC MOLECULAR DE LA VWD.....	139
2.1 Diagnòstic prenatal	140
3. AVANTATGES DE LA SEQÜENCIACIÓ COMPLETA I DIRECTA.....	141
4. AVANTATGES DEL PROTOCOL DISSENYAT.....	142
5. LA MILLOR VALIDACIÓ, ELS RESULTATS. ESTUDI DE 64 FAMÍLIES.....	145
6. MUTACIONS IDENTIFICADES.....	147
7. MÉS ENLLÀ DE LA IDENTIFICACIÓ DE LA MUTACIÓ, DESXIFRANT ELS SEUS EFECTES.....	152
7.1 Estudis in silico	153
7.2 Estudis in vivo de les PSSM	153
7.3 Estudis in vitro de les mutacions de canvi de sentit	156
8. NGS: EL PRESENT DE LES TÈCNiques DE SEQÜENCIACIÓ.....	156
9. INTEGRACIÓ DELS RESULTATS EN UN REGISTRE ON-LINE. VWFDB@HEMOBASE.....	158
10. FUTUR EN EL DIAGNÒSTIC MOLECULAR DE LA VWD.....	162
CONCLUSIONS	167
REFERÈNCIES	171
ANNEX	191
1. QÜESTIONARI PEL DIAGNÒSTIC DE LA VWD TIPUS 1:	193
2. TEST DE VALORACIÓ DE LES MENORRÀGIES.....	195
3. ALAND CONFERENCE	197
4. "HEREDITARY PSEUDOHAEMOPHILIA". FINSKA LÄKARESÄLLSKAPETS HANDLINGAR. ERIK VON WILLEBRAND 1926	205

Abreviaciones

Only those who will risk going too far can possibly find out how far one can go.

T.S. Eliot



Abreviacions



aa: aminoàcid

ADAMTS: desintegrina i metal·loproteasa amb motius trombospondina

Ag: antigen

bp: parells de bases

BS: puntuació de sagnat

cDNA: DNA complementari

cSNP: SNP localitzat en el cDNA

DDAVP: 1-deamino-8-D-arginina vasopressina

DMSO: dimetilsulfòxid

DNA: àcid desoxiribonucleic

dNTPs: desoxinucleòtids

ddNTPs: didesoxinucleòtids

FVIII: factor VIII de coagulació

FIX: factor IX de coagulació

Gp: receptor plaquetari de glicoproteïna

HA: Hemofília A

HB: Hemofília B

HUVEC: cèl·lules endotelials de vena de cordó umbilical

indel: inserció deleció

ISTH: Societat Internacional de Trombosi i Hemostasi

ABREVIACIONS

kb: kilobase

kD: kilodalton

LR-PCR: PCR de fragments llargs

LSMD: bases de dades de mutacions específiques per a un locus

mRNA: RNA missatger

ng: nanogram

nt: nucleòtid

NGS: seqüenciació de nova generació

NMD: degradació de l'mRNA mediada per mutacions sense sentit

PCR: reacció en cadena de la polimerasa

PM: pes molecular

PSSM: potencials mutacions d'splicing

PTC: codó de terminació prematur

RCo: cofactor de la ristocetina

RIPA: agregació plaquetària induïda per ristocetina

RNA: àcid ribonucleic

RT-PCR: PCR en transcripció reversa

SNP: polimorfisme d'un únic nucleòtid

STR: microsatèl·lit

µg: microgram

µl: microlitre

µM: micromolar

VNTR: minisatèl·lit

VWD: malaltia de von Willebrand

VWF: factor de von Willebrand

VWF: gen del factor de von Willebrand

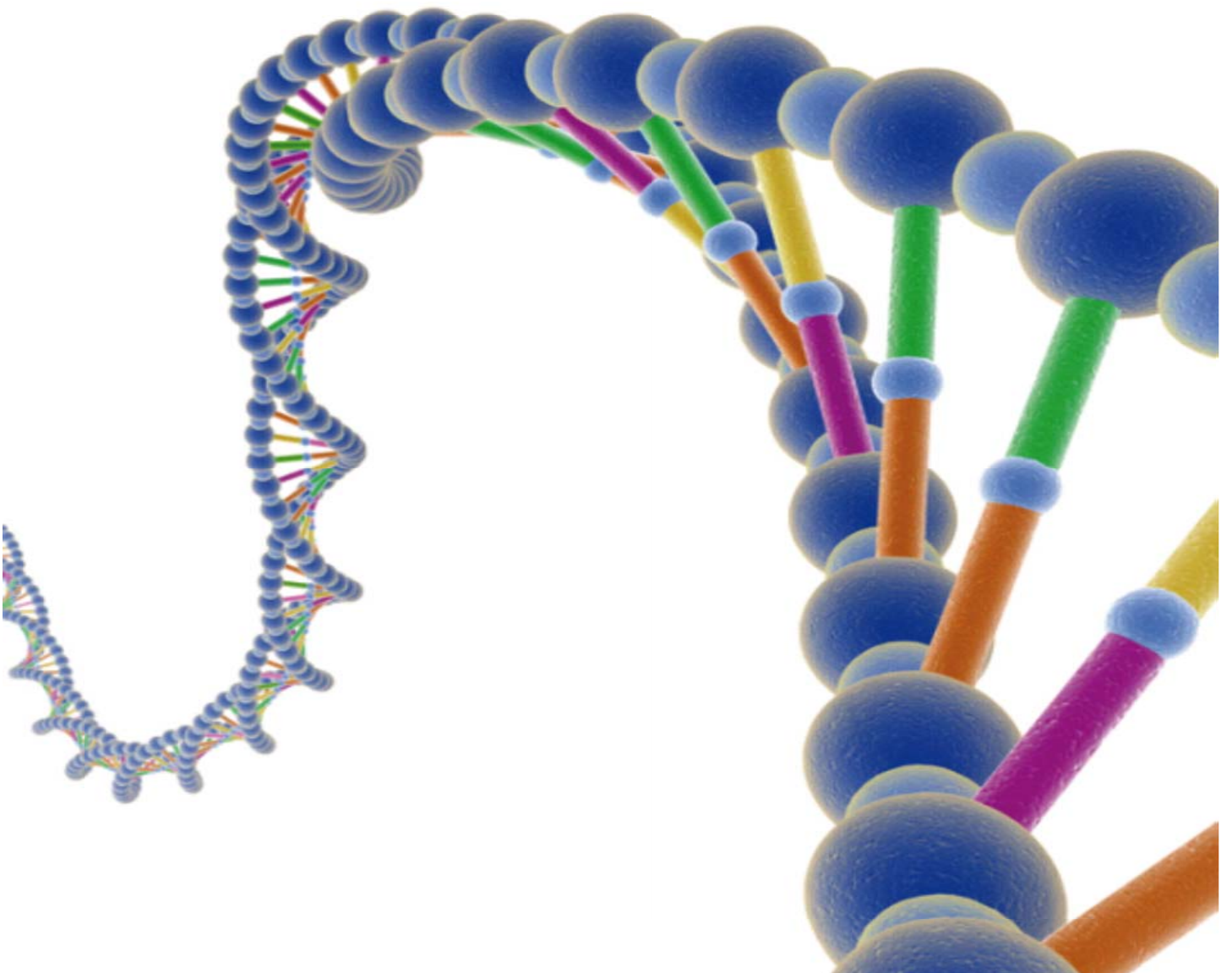
VWFP: pseudogèn del factor de von Willebrand

VWFpp: propèptid del factor de von Willebrand

Introducció

L'experimentador qui ne sait pas ce qu'il
cherche ne comprend pas ce qu'il trouve.

Claude Bernard



Introducció



1. Història de la malaltia de von Willebrand

La primera descripció d'aquesta malaltia es remunta al 1926 quan el metge finlandès Eric von Willebrand va publicar el primer manuscrit on descrivia aquest trastorn hemorràgic [Von Willebrand 1926]. El seu descobriment es deu al seguiment d'una família de l'illa de Föglö, situada a l'arxipèlag d'Åland, al Mar Bàltic. El propòsit era una nena de 5 anys anomenada Hjördis, la novena de dotze fills, quatre dels quals havien mort per hemorràgia no controlada a una edat primerenca. Examinant l'arbre genealògic va trobar que 23 dels 66 membres de la família presentaven problemes de sagnat (Figura 1). Va adonar-se, aleshores, que no es tractava d'un cas d'Hemofília donat que el trastorn afectava per igual a homes i dones i va observar que els pacients, tot i tenir un recompte plaquetari normal, presentaven un temps d'hemorràgia allargat. També l'epistaxi, els hematomes i les gingivorràgies eren més habituals en aquests pacients en lloc de les hemorràgies musculars o articulars que són més comuns a l'Hemofília. Va anomenar a aquesta malaltia Pseudoemofília hereditària i va interpretar la seva causa com un defecte de la funció plaquetària i a les parets dels vasos sanguinis. Hjördis moria a l'edat de 13 anys durant el seu quart període menstrual.

INTRODUCCIÓ

La fisiopatologia d'aquesta malaltia, ara anomenada Malaltia de von Willebrand (VWD), va ser esclarida als anys 50 quan es va demostrar que la VWD estava relacionada amb uns nivells baixos de factor VIII (FVIII) [Alexander B 1953; Larrieu 1953; Quick 1953] i que aquesta deficiència podia compensar-se mitjançant la infusió de plasma o fraccions de plasma.

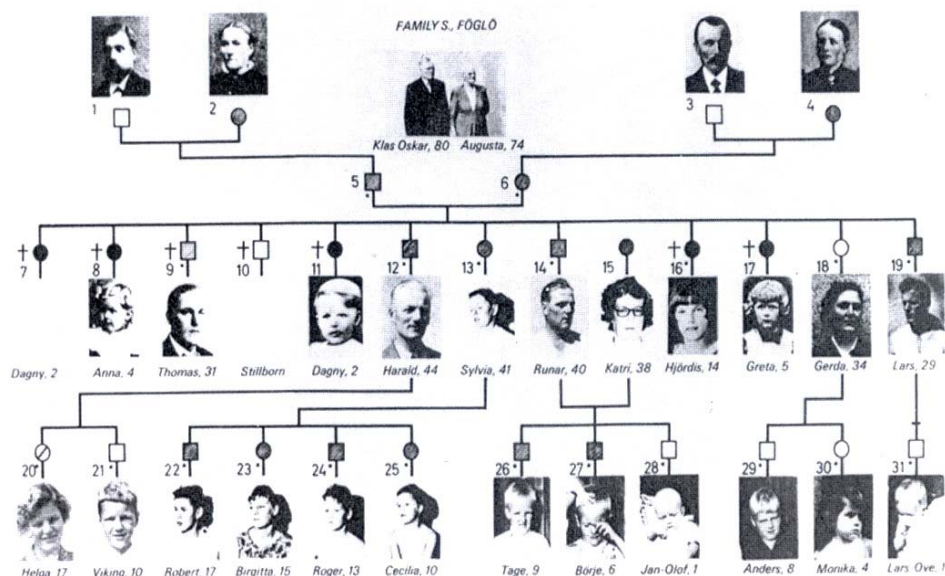


Figura 1: Arbre genealògic de la família de Föglö on es va descriure la VWD per primera vegada.

El 1957, un grup de recerca suec entre els quals hi havia Inga-Marie Nilsson, Margareta Blombäck i Irene von Francken, van descriure 13 membres de 10 famílies que presentaven desordres hemorràgics greus caracteritzats per una deficiència en el FVIII, temps de sagnat llarg, herència autosòmica dominant i manifestacions clíniques variables [Nilsson et al. 1957]. La transfusió de concentrats de plasma a aquests pacients corregia tant els episodis hemorràgics com els nivells de FVIII i escurçava el temps d'hemorràgia. Aquest fet demostrava que el defecte no era ni plaquetari ni capil·lar i que havia de tractar-se de la carència d'un factor plasmàtic. A més, aquesta compensació també es donava utilitzant un concentrat semblant preparat a partir de plasma de pacients amb Hemofília greu, és a dir, amb absència de FVIII i que no es

corregia amb transfusions de plaquetes. El van anomenar fracció plasmàtica I-0 (Figura 2) [Nilsson et al. 1957]. Aquest fet va suposar la primera evidència de la presència d'un factor hemostàtic o "Factor de von Willebrand" diferent del FVIII que era deficient al plasma dels pacients amb VWD però normal en pacients amb Hemofilia A [Shapiro et al. 1973]. El 1971 es va demostrar, mitjançant proves immunològiques, que el FVIII i el VWF eren proteïnes diferents i es va observar que la ristocetina, un antibiòtic aïllat a partir



Figura 2: Margareta i Birger Blombäck al laboratori de química el 1958 amb una ampolla de FR I-0. Aquest va ser el tractament de la VWD fins el 1980.

d'una espècie d'actinomicet, era capaç d'aglutinar plaquetes en un plasma normal, mentre que l'aglutinació no es donava en pacients amb VWD [Howard and Firkin 1971]. En base a aquests descobriments, es va desenvolupar un mètode quantitatiu per tal de valorar la funció de les plaquetes conegut com a activitat del cofactor de la ristocetina (RCo) [Weiss et al. 1973]. El primer intent de classificació de la VWD data de 1977 quan es van destacar quatre tipus diferents: VWD pura; dos defectes de la funció plaquetària, el defecte de ciclooxigenasa i el defecte de tipus aspirina; i una barreja entre la VWD i el defecte de ciclooxigenasa. La diferència entre el FVIII i el VWF va quedar definitivament demostrada quan el 1985, quatre grups de recerca independents van caracteritzar el VWF [Ginsburg et al. 1985; Kolata 1985; Sadler et al. 1985; Verweij et al. 1985]. El 1992, membres de quatre famílies de les illes Åland amb VWD van ser estudiades mitjançant un screening de mutacions dels exons 18, 28, 32, 43 i 45 del gen. A totes elles es va identificar la deleció d'una citosina a l'exó 18 (c.2435delC) i, mitjançant anàlisis de lligament i estudis genealògics, es va determinar el seu origen comú [Blombäck 1999]. D'aquesta manera, seixanta anys després de la mort de Hjördis Sundblom, s'identificava la mutació familiar causant de la VWD.

2. Clínica de la malaltia de von Willebrand

2.1 Epidemiologia

La VWD és una coagulopatia congènita que constitueix el síndrome hemorràgic hereditari més freqüent a l'ésser humà. El trastorn es transmet amb caràcter autosòmic dominant o, menys freqüentment, recessiu, i existeix una forma adquirida associada a la producció d'anticossos contra el VWF [Bloom 1991; Holmberg and Nilsson 1992; Lopez-Fernandez et al. 1992]. Presenta una distribució homogènia i la seva prevalença a la població humana varia depenent de l'enfocament que es prengui per a definir el seu diagnòstic. Així, fins a finals de 1980, la seva prevalença s'estimava a partir del nombre de pacients registrats als centres especialitzats, el que suposava entre 4 i 10 casos per 100.000 habitants [Bachmann 1980; Bloom 1980]. A Itàlia, un estudi en nens en edat escolar aparentment asimptomàtics va concloure que uns 8.000 individus per milió havien heretat defectes a la funció del VWF [Rodeghiero et al. 1987]. En general s'assumeix que el nombre de pacients amb VWD simptomàtica que requereixen tractament específic es troba al voltant dels 100 individus per milió [Sadler et al. 2000] tot i que durant molt de temps s'ha assumit que la seva prevalença a la població general era de l'1% [Castaman et al. 2003].

Una recent publicació [Lee 2010] determina que la prevalença global per a la VWD és d'entre 40 i 100 pacients per milió. Per tipus, s'estima que el 70% dels casos són de tipus 1, el 17% de tipus 2A i el 13 % de tipus 3. En l'últim estudi epidemiològic realitzat a nivell nacional [Battle 2010], es va enviar un qüestionari sobre VWD a un total de 54 centres especialitzats repartits per tot l'estat, dels quals van respondre 36 (un 66,6%). L'estudi conclou que l'estimació del nombre de pacients amb una VWD clara, és a dir, amb nivells de VWF:Ag < 30%, és de 129 individus per milió, entre els quals, només 2/3 tenen un diagnòstic clar. En quant als pacients amb possible VWD s'estima que hi ha 85 individus per milió, que sumats als VWD clars dona una prevalença d'al voltant

de 214 individus per milió. En quant als subtipus, es calcula que un 77% dels pacients presenta VWD de tipus 1, un 18% són de tipus 2 i al voltant del 5% serien de tipus 3.

2.2 Diagnòstic

2.2.1 Manifestacions clíniques

La VWD consisteix a una diàtesi hemorràgica causada per una deficiència qualitativa i/o quantitativa del VWF. Els seus símptomes són tots aquells relacionats amb la disfunció plaquetària i inclouen epistaxis recorrents, hematomes, sagnat perllongat per mínims traumatismes, sagnat a la cavitat oral i menorràgies, hemorràgies post intervenció quirúrgica i hemorràgies post part com a clínica més freqüent. Els pacients de tipus 3, degut a que també presenten un dèficit de FVIII (veure apartat 2.3.1), poden presentar altres símptomes menys habituals com són l'hemartrosi, hematomes musculars i les hemorràgies gastrointestinals o cerebrals. L'avaluació clínica de la VWD es basa principalment en l'acumulació d'un historial personal objectiu d'hemorràgies mucocutànies excessives. Amb aquest propòsit, s'han creat diferents qüestionaris per tal de puntuar la clínica hemorràgica (BS) relacionats amb el número i la gravetat dels símptomes, un dels quals va ser utilitzat per a validar els criteris clínics pel diagnòstic de la VWD de tipus 1 en un estudi multicèntric internacional [Rodeghiero et al. 2005]. Posteriorment es creà un qüestionari semblant al sistema del BS per avaluar la gravetat del sagnat. Aquest qüestionari contempla un total de 12 símptomes i la gravetat amb la que es manifesten amb una puntuació que va des de -1 ó 0 si no s'ha presentat cap sagnat, fins a 4 si el sagnat ha requerit tractament (veure Annex 1). Amb l'objectiu de determinar el valor dels marcadors clínics, fenotípics i moleculars per al diagnòstic de la VWD de tipus 1, aquest estudi es va validar en un ampli nombre de famílies incloses en un estudi multicèntric europeu de VWD, el "Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 von Willebrand disease" (MCMDM-1 VWD) [Tosetto et al. 2006] (veure apartat 5.3.1).

2.2.2 Història familiar

La majoria dels tipus de VWD segueixen una herència autosòmica dominant, pel que pot haver un historial familiar d'hemorràgies significatiu. Tot i això, la majoria de formes de la malaltia presenten una penetrància incompleta i expressivitat variable dels símptomes hemorràgics dins de cada família [Levy and Ginsburg 2001]. Els tipus 2N i 3 de la VWD, en canvi, presenten un patró d'herència autosòmica recessiva amb pares que, habitualment, no manifesten símptomes clínics. Així doncs, s'observa una gran variabilitat en la clínica, tant pel que respecta al tipus com a la gravetat dels símptomes, inclús entre els membres afectes pertanyents a la mateixa família.

2.2.3 Proves de laboratori

Els components essencials per al diagnòstic de la VWD inclouen mesures quantitatives i qualitatives del VWF i del FVIII [Favaloro et al. 2004]. Les proves més habituals són:

- **VWF:Ag**, antigen del VWF que mesura la quantitat de factor mitjançant una anàlisi immunològica. Aquest test és essencial pel diagnòstic de la VWD ja que més del 80% dels pacients de VWD tenen nivells reduïts de VWF:Ag. [Budde 2008]
- **VWF:RCo**, cofactor de ristocetina, és un immunoassaig funcional que mesura la capacitat de la sang del pacient per aglutinar les plaquetes en presència de ristocetina i, per tant, mesura l'activitat funcional del VWF. Aquest test permet la identificació de defectes qualitius de la VWD [Weiss et al. 1973].
- **FVIII:C**, activitat coagulant del FVIII que mesura la seva activitat funcional. Nivells baixos d'aquest factor de coagulació són determinants en la identificació de pacients amb VWD de tipus 2N [Budde 2008].
- **Multimers**, ofereixen una visió de com s'organitzen els monòmers de VWF. Mesura la quantitat i l'estructura molecular del VWF (veure Figura 4). Aquesta

prova resulta essencial en el diagnòstic de la VWD de tipus 2 degut a que, una prova definitiva per diferenciar entre els tipus 2A i 2M és, respectivament, l'absència o la presència de multimers d'alt pes molecular [Budde et al. 2006].

- **RIPA**, analitza la funció plaquetària mesurant l'agregació de les plaquetes induïda per la ristocetina. Aquesta prova serveix per determinar la VWD de tipus 2B ja que aquests pacients són hiperreactius per aquest test degut a un increment de l'afinitat del VWF pel receptor de les plaquetes [Howard and Firkin 1971] (veure apartat 2.3.2).
- **VWFpp**, propèptid que es sintetitza com a part del pro-VWF (veure apartat 3.1) i és posteriorment escindit, emmagatzemat i secretat amb el VWF madur en una relació equimolar [Fay et al. 1986]. Els nivells de propèptid circulants es poden utilitzar com a marcadors de la síntesi del VWF [Haberichter et al. 2006]. D'aquesta manera, en individus amb nivells baixos de VWF, el nivell de propèptid es troba igualment disminuït, mentre que en pacients amb nivells normals de síntesi de VWF però amb una supervivència a la circulació reduïda, s'observa un increment de la relació VWFpp:VWF [Haberichter et al. 2006].
- **PFA-100**, analitza la funció plaquetària. Dóna una mesura ràpida i senzilla de la funció de les plaquetes dependent de VWF i permet substituir la prova del temps de sagnat que es presenta amb resultats anormals en la majoria d'afectats per la VWD [Quiroga et al. 2004; Favaloro 2002]. Els pacients amb VWD de tipus 1 greu o de tipus 3 presenten valors anormals de PFA-100, mentre que pacients amb VWD tipus 1 lleu o moderat i alguns de tipus 2 poden presentar valors normals [Posan et al. 2003].

Degut a la considerable variabilitat temporal que podem trobar en els valors del VWF i del FVIII, és necessària la repetició d'aquestes proves abans de poder confirmar o

INTRODUCCIÓ

excloure un diagnòstic de VWD [Abildgaard et al. 1980; Blomback et al. 1992]. Aquestes mesures també ens permeten establir la classificació en subtipus de la VWD.

Sovint el diagnòstic clínic de la VWD pot veure's compromès degut a que les concentracions plasmàtiques del VWF són sensibles a variables ambientals com ara l'estrès, l'exercici físic, el tabac, alguns fàrmacs, la fase del cicle menstrual, l'embaràs, etc. [Wahlberg et al. 1984; Zhang et al. 1995; Castaman et al. 1999], i a factors genètics com ara el grup sanguini ABO, que també influeixen en els nivells de VWF circulants. Es coneix que els individus amb un grup sanguini O tenen nivells entre un 20-25% més baixos que individus de qualsevol altre grup sanguini [Gill et al. 1987]. Per a realitzar un diagnòstic fiable de la VWD cal tenir en compte components clínics i de laboratori. Per una banda, cal una manifestació clínica d'hemorràgies significatives en el pacient i una avaluació de laboratori que sigui compatible amb un defecte quantitatiu i/o qualitatiu, a més d'una història familiar positiva per a VWD o la presència d'una mutació al VWF [Sadler and Rodeghiero 2005]. L'absència d'història hemorràgica però, no exclou el diagnòstic de la VWD donat que, aproximadament la meitat dels pacients amb VWD de tipus 1 o 2 no solen presentar clínica prèvia de sagnat [Nichols and Ginsburg 1997].

2.3 Classificació

Històricament s'han proposat diferents classificacions degut a la gran variabilitat de la VWD, sent acceptada actualment la classificació proposada pel Subcomitè del Factor von Willebrand de la ISTH [Sadler et al. 2006]. Aquesta classificació diferencia entre dèficits quantitius (tipus 1 per a la deficiència parcial i tipus 3 per a la deficiència greu) i dèficits qualitius (tipus 2). Es distingeixen un total de 6 categories que corresponen a diferents mecanismes fisiopatològics i procuren correlacionar les diferents característiques clíniques i els requeriments terapèutics (Figura 3).

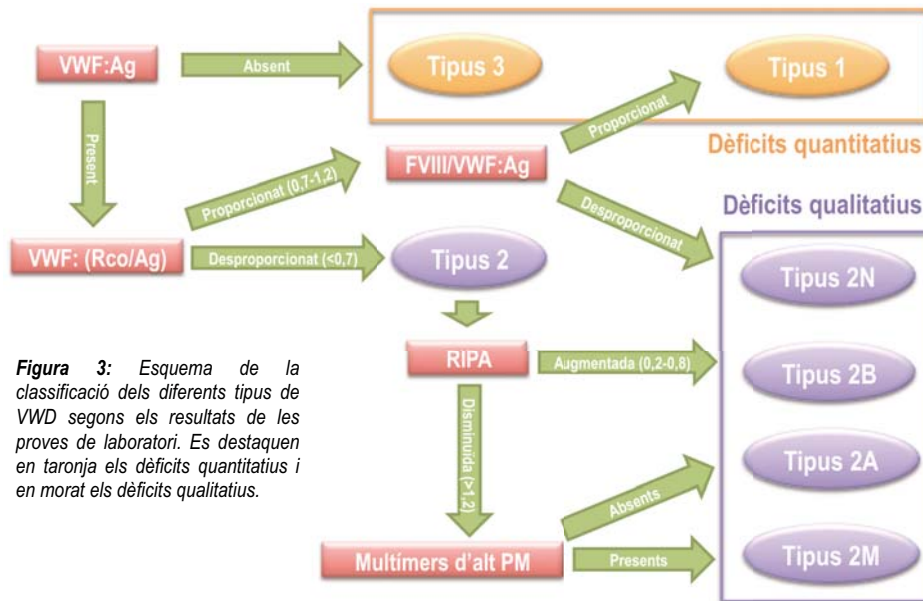


Figura 3: Esquema de la classificació dels diferents tipus de VWD segons els resultats de les proves de laboratori. Es destaquen en taronja els dèficits quantitius i en morat els dèficits qualitius.

2.3.1 Dèficits quantitius

Es caracteritzen per presentar una disminució dels nivells normals de VWF. Es diferencien dos tipus principals: el tipus 1, caracteritzat per una reducció lleu dels nivells de VWF i el tipus 3, que representa l'absència total de factor.

- Tipus 1.** És la forma més comú de la VWD donat que representa al voltant del 75% del total de casos i s'hereta de forma autosòmica dominant (Figura 5a), encara que presenta una penetrància incompleta. Es caracteritza per una deficiència entre lleu i moderada dels nivells plasmàtics del VWF:Ag i VWF:RCo causada per la retenció intracel·lular del VWF [Eikenboom et al. 2009] o per una disminució del seu temps de vida mitjà un cop alliberat al plasma [Castaman et al. 2009]. Els nivells de FVIII:Ag es veuen reduïts proporcionalment a la deficiència del VWF degut a una ràpida degradació, fet que es troba relacionat amb la clínica hemorràgica en aquests pacients. Donat que el VWF és normal a nivell funcional, els multimers presenten una deficiència quantitativa però se n'observen de tots els pesos moleculars (Figura 4). El seu diagnòstic es basa en tres paràmetres: una

història hemorràgica rellevant, resultats de laboratori compatibles amb VWD de tipus 1 i una història familiar indicativa de VWD [Sadler and Rodeghiero 2005]. Tot i això, la presència d'altres factors genètics que poden afectar als nivells de VWF, l'efecte del grup sanguini [Gill et al. 1987] i els efectes ambientals [Zhang et al. 1995; Castaman et al. 1999] poden ajudar a explicar la penetrància incompleta que presenta aquest tipus de VWD, així com les variacions de la clínica entre pacients, fins i tot entre membres d'una mateixa família.

- **Tipus 3.** És la forma més greu de la VWD i es caracteritza per l'absència pràcticament total de VWF. Tots els nivells plasmàtics es troben reduïts a nivells inferiors al 5% [Sadler et al. 2006] i la presència de multímers és pràcticament nul·la (Figura 4). La seva prevalença és d'1 a 3 persones per milió, tot i que en poblacions on és habitual el matrimoni consanguini la seva prevalència és especialment alta. L'herència d'aquesta deficiència presenta un patró autosòmic recessiu (Figura 5b) i els progenitors de pacients amb VWD de tipus 3 acostumen a presentar clíniques molt lleus o ser totalment asimptomàtics. Els pacients, en canvi, solen presentar hemorràgies mucocutànies recurrents i hemorràgies musculoesquelètiques, símptomes més habituals a l'Hemofília i que estan provocats per un defecte secundari de FVIII. Al llarg del temps, si el tractament en aquests pacients no és l'adequat, poden aparèixer lesions cròniques a les articulacions que requereixin cirurgia protèsica [Lillicrap 2008]. El diagnòstic molecular en aquests pacients és essencial per a realitzar consell genètic en estudis prenatals.

2.3.2 Dèficits qualitius

L'actual classificació de la VWD reconeix quatre formes qualitatives diferents amb manifestacions clíniques semblants a la VWD de tipus 1 [Lillicrap 2008]:

- **Tipus 2A.** És la més comú de les variants qualitatives, amb una incidència del 10-15% de tots els diagnòstics per VWD. Es caracteritza per la pèrdua de funció del

VWF depenent de les plaquetes degut a l'absència de multímers d'alt pes molecular (Figura 4), ja sigui per una incapacitat biosintètica deguda a mutacions localitzades a les regions responsables de la formació dels multímers o per la seva degradació prematura per ADAMTS-13 un cop alliberats al plasma [Lillicrap 2008]. L'ADAMTS-13 és una metal·loproteasa que talla el VWF entre la tirosina 1.605 i la metionina 1.606 en el domini A2 i trenca els multímers en unitats més petites que són degradades per altres peptidases [Levy et al. 2005]. La VWD de tipus 2A presenta una baixa relació entre el VWF:RCo i el VWF:Ag amb absència de multímers d'alt PM i disrupció de la capacitat d'aglutinació plaquetària induïda per ristocetina (RIPA). Les mutacions identificades en aquests pacients es troben localitzades entre els dominis D2, A1 i A2 (veure apartat 3.1) i la seva herència és dominant (Figura 5a).

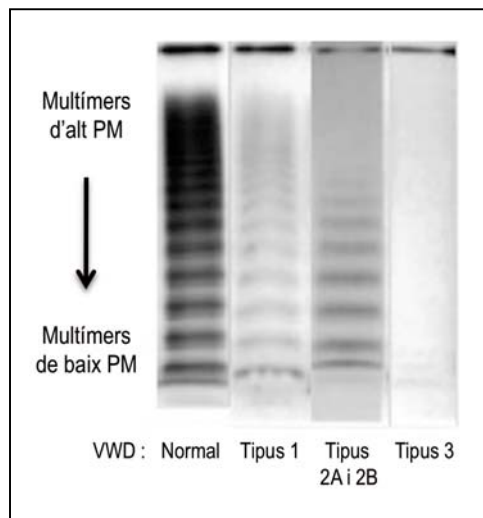


Figura 4: Anàlisi dels multímers del VWF. En el patró normal s'observen multímers d'alt i de baix pes molecular. Reducció generalitzada de tots els multímers en el tipus 1, absència de multímers d'alt pes molecular en els tipus 2A i 2B, i absència de gairebé total de multímers en el tipus 3. Modificat de [Pruthi 2006]

- **Tipus 2B.** Aquest subtipus de la VWD està associat a un increment de l'afinitat per les plaquetes com a resultat de mutacions localitzades a la regió d'unió de la glicoproteïna Ib (GpIb), al domini A1 del VWF. Aquestes mutacions incrementen la capacitat d'adhesió del VWF al receptor GpIb provocant interaccions espontànies entre la proteïna i les plaquetes circulants. Els pacients amb VWD de tipus 2B

INTRODUCCIÓ

presenten una baixa relació entre el VWF:RCo i el VWF:Ag amb disminució dels multímers d'alt PM degut a que es troben units a les plaquetes (Figura 4). Una prova per al diagnòstic diferencial de la VWD de tipus 2B és la demostració de l'augment de la capacitat d'aglutinació plaquetària induïda per ristocetina (RIPA) [Michiels et al. 2006; Sadler et al. 2006]. S'hereta amb un patró autosòmic dominant (Figura 5a) i suposa al voltant del 20% de tots els casos de VWD de tipus 2 [Keeney and Cumming 2001].

- **Tipus 2M.** Aquest subtipus es caracteritza per una baixa relació entre el VWF:RCo i el VWF:Ag i una disminució de la RIPA però, a diferència del tipus 2A, amb la presència d'un patró multimèric normal. L'assemblatge i la secreció dels multímers d'alt PM és normal i el defecte funcional es deu a mutacions localitzades al domini A1, implicat en la unió del VWF a plaquetes o al subendotel·li (veure apartat 3.2) i que són les responsables de la discrepància entre funció i antígen. Sembla que la reducció de la unió a plaquetes redueix l'exposició de les subunitats de VWF al trencament per ADAMTS-13, preservant l'estructura multimèrica [Sadler et al. 2006]. La seva herència és dominant (Figura 5a) i presenta una penetrància completa.
- **Tipus 2N.** Aquesta variant qualitativa de la VWD és diferent a les altres per que el seu patró d'herència és autosòmic recessiu (Figura 5b). Les mutacions que causen aquest tipus de VWD es localitzen als dominis D' i D3 del VWF i cal que s'hagin heretat en homozigosi o en heterozigosi composta amb una altra mutació per tal que s'observi el seu efecte [Sadler et al. 2006]. Els patrons multimèrics són normals i, sovint, l'única variació en els tests de laboratori és una disminució dels nivells de FVIII, motiu pel qual sovint s'ha diagnosticat erròniament com a Hemofília A lleu o moderada [Schneppenheim et al. 1996]. Les mutacions d'aquest tipus de VWD es troben localitzades als punts d'unió al FVIII, entre la Serina 764 i l'Arginina 1.035, en el domini D' i part del D3 (veure apartat 3.1) [Mazurier et al. 2001]

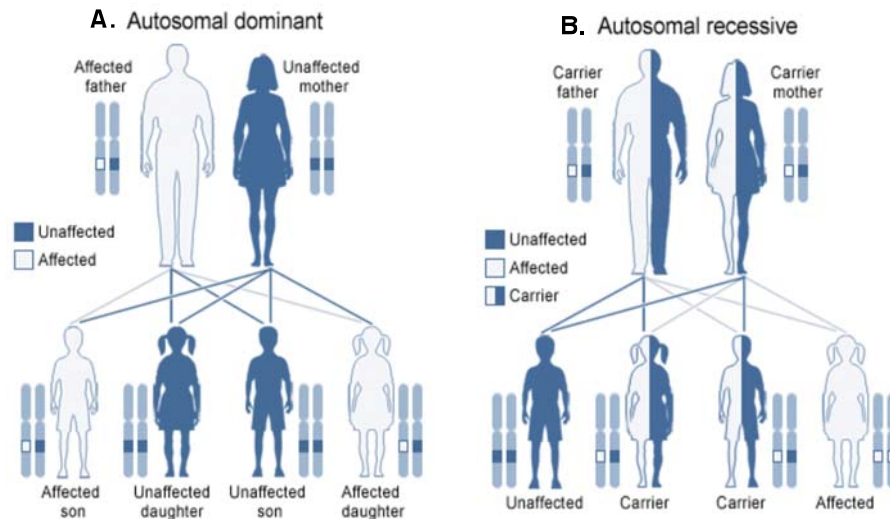


Figura 5: A. Esquema de l'herència autosòmica dominant. Aquest patró el segueixen la VWD de tipus 1, 2A, 2B i 2M. B. Esquema de l'herència autosòmica recessiva. Aquest patró el segueixen la VWD de tipus 2N i 3. Adaptat de la U.S. National Library of Medicine

2.4 Prevenció i tractament

El tractament de la VWD es basa en el reemplaçament de la proteïna deficient en el moment del sagnat espontani o abans de la realització d'un procediment invasiu. La profilaxi regular no s'utilitza amb tanta freqüència com en el cas de l'hemofília, ja que la tendència hemorràgica sol ser menys greu, però s'ha de contemplar en el cas de pacients de tipus 3 que pateixen hemartrosis recurrents o sagnats gastrointestinals [Mannucci 2004]. En termes generals, els tipus de tractament poden dividir-se en dos grups: teràpies coadjuvants que proporcionen un benefici hemostàtic indirecte, i tractaments que incrementen els nivells plasmàtics de VWF i FVIII [Mannucci 2001] [Federici et al. 2006].

2.4.1 Teràpies coadjuvants

Les hemorràgies en mucoses (epistaxi, gingivorràgies, menorràgies, etc.) són símptomes habituals de la VWD degut a l'activitat fibrinolítica de les mucoses. Aquesta activitat consisteix en la degradació de les xarxes de fibrina formades en el procés de

INTRODUCCIÓ

coagulació sanguínia, evitant la formació de trombus [Cesarman-Maus and Hajjar 2005]. Les teràpies coadjuvants poden utilitzar-se amb importants beneficis per al tractament de la VWD, particularment en circumstàncies com ara cirurgies menors i intervencions dentals, així com per al tractament de la menorràgia. Aquestes teràpies inclouen l'ús d'agents antifibrinolítics i l'aplicació de preparacions hemostàtiques tòpiques en els llocs d'hemorràgia exposats. Els agents antifibrinolítics milloren l'hemostàsia en inhibir la fibrinòlisi i són especialment útils en hemorràgies per mucoses [Mannucci 1998]. En dones amb menorràgia, l'administració d'una teràpia hormonal que funciona elevant parcialment les concentracions de VWF i FVIII, ja sigui amb una combinació d'anticonceptius o amb sistemes intrauterins amb progesterona, sovint aporten beneficis clínics considerables [Kingman et al. 2004].

2.4.2 Teràpies que incrementen les concentracions de factor de coagulació

Per augmentar de manera aguda les concentracions de VWF i FVIII en pacients amb VWD existeixen dos mètodes àmpliament utilitzats: l'administració parenteral o nasal de desmopressina i la infusió intravenosa de concentrats de VWF/FVIII derivats de plasma:

- **Desmopressina o DDAVP** és un anàleg sintètic de l'hormona antidiürètica vasopressina que, donat que indueix l'alliberament del VWF emmagatzemat als teixits, té un paper important en la prevenció i el tractament d'episodis hemorràgics en alguns pacients amb VWD de tipus 1 [Millar et al. 2008], 2A [Nichols and Ginsburg 1997], 2M [Lopez-Fernandez et al. 1991] i 2N [Mazurier et al. 1994]. Per altra banda, no és eficaç pel tractament de pacients amb VWD de tipus 3, que no sintetitzen VWF, i pot ser contraproductiu en pacients de tipus 2B degut a que pot produir trombopènia [Rendal et al. 2001]. Aquest mètode de tractament, relativament econòmic i sense riscos de transmissió d'agents infecciosos [Federici et al. 2006] s'utilitza àmpliament i mitjançant totes les vies d'administració: intravenosa, subcutània i intranasal [Mannucci 2004] i ajuda en

la prevenció d'hemorràgies relacionades amb cirurgies menors i intervencions dentals així com pel tractament d'hemorràgies menstruals greus.

- **Concentrats de VWF/FVIII** s'utilitzen en els tipus 2B i 3 en els que el DDAVP està contraindicat, en els tipus 1 i 2 en que la desmopressina no és eficaç [Federici et al. 2004] o en situacions en les que s'anticipa un risc elevat d'hemorràgia. En aquests casos poden restablir-se els nivells de VWF i FVIII mitjançant la infusió de concentrats d'aquestes proteïnes derivats de plasma. Els crioprecipitats van constituir un dels pilars del tractament de la VWD per contenir bons nivells de VWF i FVIII, amb una estructura multimèrica normal. Actualment es troben en desús degut a l'aparició del DDAVP i, posteriorment, als concentrats comercials de VWF que són sotmesos a procediments d'inactivació viral [Mannucci et al. 2002]. Al mercat es troben diferents concentrats comercials i, si bé no és imprescindible una estructura multimèrica idèntica a la del VWF plasmàtic, sí que és important que siguin rics en multímers d'alt PM, el que sol implicar una millor activitat. Les característiques del VWF d'aquests concentrats varien segons el procés de fabricació i la degradació que pateixen aquests multímers. Probablement, el més utilitzat i considerat de referència a tot el món es, des de fa temps, l'Haemate-P® (Aventis-Behring) [Mannucci 2001], l'estructura multimèrica del qual és la més semblant al patró normal [Berntorp 2009], encara que n'hi ha d'altres com Wilate® (Octapharma) o Fanhdi® (Grifols) [Bello et al. 2007] que també tenen una estructura del VWF molt conservada. El Facteur Willebrand® (CRTS, Lille) és un concentrat d'alta puresa que gairebé no conté FVIII. Després de la seva infusió es produeix un increment immediat del VWF mentre que el FVIII plasmàtic va augmentant progressivament. A Espanya, només l'Haemate-P® es troba indicat per al tractament de la VWD.

2.4.3 El futur en el tractament de la VWD

Si bé els tractaments actuals per a la VWD són tan eficaços com segurs a la majoria dels casos, segueixen existint oportunitats per a avenços terapèutics addicionals. Ja el

INTRODUCCIÓ

1995 es van presentar les primeres dades de producció a gran escala d'un VWF recombinant amb una estructura multimèrica intacta i amb les modificacions post-traduccionals adequades que corregia els defectes plasmàtics en gossos amb VWD [Schwarz et al. 1997; Turecek et al. 1997; Schwarz et al. 2002]. Una altra aproximació és l'ús de la citoquina interleuquina-11, que s'ha demostrat que incrementa els nivells plasmàtics de FVIII i VWF en ratolí [Denis et al. 2001] i en humans [Kaye 1996], podria generar una nova forma de tractament com a complement a l'administració de desmopressina, amb l'ús d'aquesta quan cal un efecte hemostàtic a curt termini i amb la interleuquina-11 quan cal que l'efecte hemostàtic duri més temps. Tot i que la teràpia gènica s'ha plantejat com a mètode terapèutic en l'Hemofília A i B [Mannucci and Tuddenham 2001], donat que els tractaments actualment disponibles per als pacients amb VWD són força satisfactoris i que el nombre de pacients amb una clínica greu és baix, la teràpia gènica no s'ha contemplat com a una opció terapèutica per a la VWD [Federici et al. 2006].

3. Bases moleculars de la malaltia de von Willebrand

3.1 Proteïna VWF

El VWF és una glicoproteïna adhesiva sintetitzada en forma de molècula precursora amb una grandària de 2.813 aa coneguda com a pre-pro-VWF i que inclou un pèptid senyal de 22 aa, un propèptid de 741 aa i una subunitat madura de 2.050 aa [Mancuso et al. 1989]. El pre-pro-VWF està constituït per una sèrie de segments homòlegs o dominis, cadascun dels quals es troba repetit de dos a quatre vegades: D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2 [Shelton-Inloes et al. 1986] i són els responsables de la unió del VWF a d'altres molècules, permetent l'adhesió i l'agregació plaquetària. D'aquesta manera, els dominis D1, D2, D' i D3 participen en la regulació del procés de formació de multímers, i les regions D' i D3 també ho fan en la unió amb el FVIII. Tant

el domini A1 com l'A3 tenen propietats d'unió al col·lagen. Els dominis d'unió a plaquetes són l'A1, al Gplb, i el domini C2, al GplIb/IIIa [Lillicrap 2008] (Figura 6).

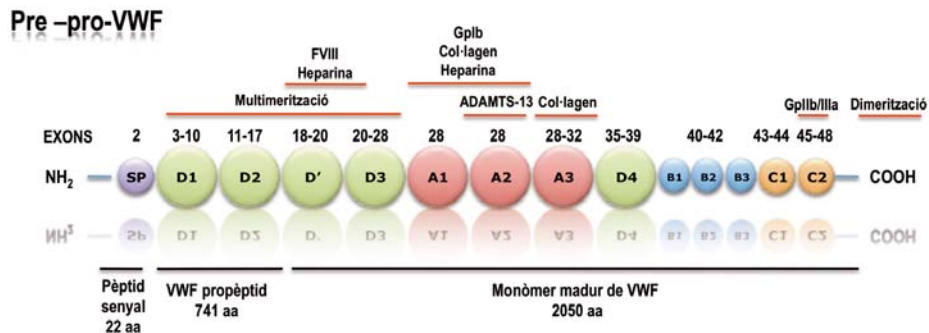


Figura 6: Estructura del VWF. S'indiquen els exons que inclouen cada un dels dominis i les seves funcions específiques.

Es requereix una complexa maquinària post-traducciona per arribar a l'estructura multimèrica del VWF. Després de la translocació al reticle endoplasmàtic, el pèptid senyal és eliminat i el pro-VWF dimertiza mitjançant la formació de ponts disulfur entre els extrems carboxi-terminals [Marti et al. 1987]. La formació de multímers continua a l'aparell de Golgi on s'allibera el propèptid (D1-D2) i els dímers s'uneixen mitjançant la formació de ponts disulfur en els dominis D' i D3 de la regió N-terminal del VWF (Figura 7). Un cop s'ha realitzat la seva síntesi, el VWF en forma de multímers d'alt pes molecular (500 a 20.000 kD) [Jaffe et al. 1974], és secretat de forma constitutiva per les cèl·lules endotelials [Sporn et al. 1986] o emmagatzemat als cossos de Weibel-Palade dels megacariòcits i als α -grànuls de les plaquetes per a una secreció regulada [Meyer et al. 1991]. La seva alliberació al plasma es dona en resposta a una àmplia varietat d'estímuls fisiològics i farmacològics. Un cop alliberats de la cèl·lula de síntesi, els multímers de VWF més grans, que tenen funció adhesiva, s'uneixen a la superfície de la cèl·lula endotelial i són sotmesos a una reducció fisiològica de la seva mida. Aquest procés de reducció es dona per una fragmentació proteolítica portada a terme per l'ADAMTS-13, que té el punt de tall del VWF al domini A2 (veure apartat 2.3.2) [Tsai 2003; Moake 2004]. Mutacions en el gen de l'ADAMTS-13 donen com a resultat la

INTRODUCCIÓ

producció de complexos anormalment llargs de VWF i la malaltia de la púrpura trombòtica trombocitopènica (PTT) [Zhou et al. 2010].

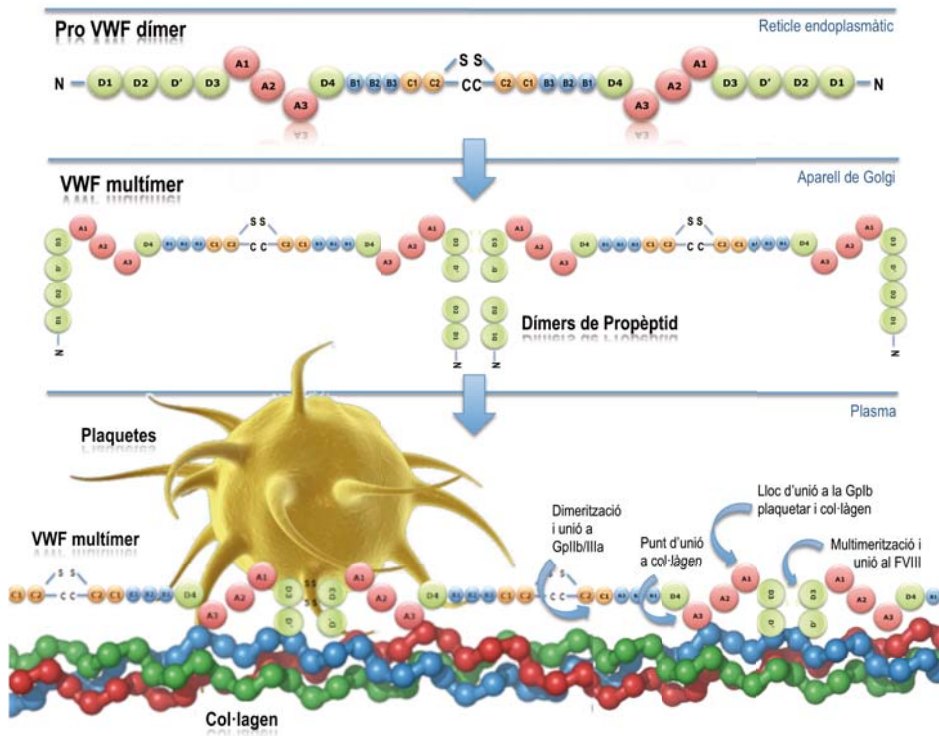


Figura 7: Procés de multimerització del VWF en cada un dels compartiments cel·lulars i funcions dels diferents dominis dels multimers.

3.2 Funció del VWF a l'hemostàsia

L'hemostàsia és el mecanisme que té l'organisme per evitar la pèrdua de sang després d'un trencament vascular mitjançant la regulació de l'equilibri entre l'estimulació i la inhibició de la formació del coàgul. Aquest procés consisteix en una gran xarxa coordinada de més de 100 proteïnes diferents en les que participen factors de coagulació, inhibidors, components de la fibrinòlisi, plaquetes i endoteli vascular. Qualsevol alteració d'aquest equilibri desplaçaria l'hemostàsia fisiològica cap a estats patològics hemorràgics o trombòtics. Les proteases i cofactors proteics que componen

la cascada de coagulació circulen pel torrent sanguini en forma de precursors inactius i s'han d'activar seqüencialment en el lloc de la lesió per formar el coàgul de fibrina. Davant d'una lesió vascular, es produeix una vasoconstricció reflexa com a resposta immediata produïda pel sistema nerviós simpàtic, desencadenant un espasme vascular que redueix el diàmetre del vas i retarda l'hemorràgia. Això afavoreix que les cèl·lules sanguínies s'apropin al lloc de la lesió, el que facilita les interaccions entre les plaquetes i el subendoteli iniciant-se l'hemostàsia primària i la secundària.

3.2.1 Hemostàsia primària.

És el procés de formació del tap plaquetari que s'inicia després de la lesió vascular (Figura 8). Les capacitats d'adherència del VWF són crucials en vasos en els que la ràpida circulació sanguínia s'oposa al creixement del tap plaquetari. Gràcies a la capacitat d'adhesió dels multimers, el VWF plasmàtic s'uneix ràpidament al col·lagen subendotelial exposat a la circulació sanguínia a

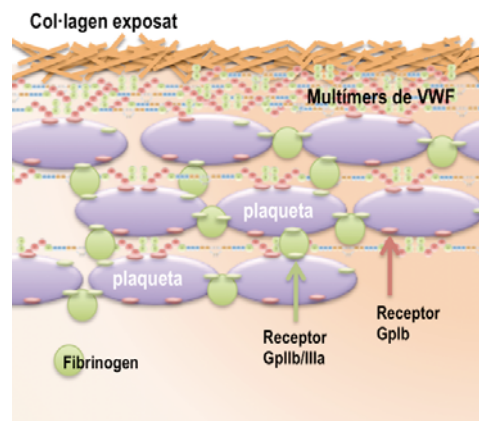


Figura 8: Esquema de l'hemostàsia primària. Trombus creixent per l'agregació plaquetària produïda pel VWF i el fibrinogen.

través del seu domini A3 iniciant-se l'hemostàsia primària. Un cop el VWF s'ha unit al col·lagen, aquest queda immobilitzat i permet l'adhesió de les plaquetes circulants a través del seu receptor GpIb que s'uneix al domini A1 del VWF [Fujimura et al. 1987; Mendolicchio and Ruggeri 2005]. Aquesta unió és més eficient en vasos on la circulació sanguínia és més ràpida donat que els multimers de VWF es despleguen i redueixen la velocitat de pas de les plaquetes facilitant la seva unió [Savage et al. 1996]. Aquesta interacció activa la plaqueta produint un canvi en la seva forma, l'alliberació del VWF dels α -grànuls al plasma i l'activació conformacional de les integrines de la plaqueta GpIb-IIIa. Un cop s'ha format la primera capa de plaquetes, el VWF, junt amb el

INTRODUCCIÓ

fibrinogen, funciona com a lligand i crea ponts entre les plaquetes en el trombus creixent. El domini C1 del VWF presenta llocs d'unió específics als receptors GpIIb-IIIa i s'uneix simultàniament a diversos lligands situats en plaquetes diferents, el que provoca la formació d'una xarxa de plaquetes i fibrinogen que és el que constitueix el coàgul primari, que és soluble i reversible [Sadler 1998].

3.2.2 Hemostàsia secundària.

És un procés enzimàtic complex pel qual es forma el coàgul secundari, estable i insoluble (Figura 9). Aquest procés es deu a un canvi químic del fibrinogen que el converteix en insoluble i li dóna la capacitat d'entrelligar-se amb altres molècules per formar enormes agregats en forma de xarxa tridimensional, entre els quals es troben bloquejades les plaquetes. Hi ha un gran nombre de factors de la coagulació implicats en aquest procés i el VWF fa de transportador del FVIII protegint-lo de la degradació proteolítica prematura. El

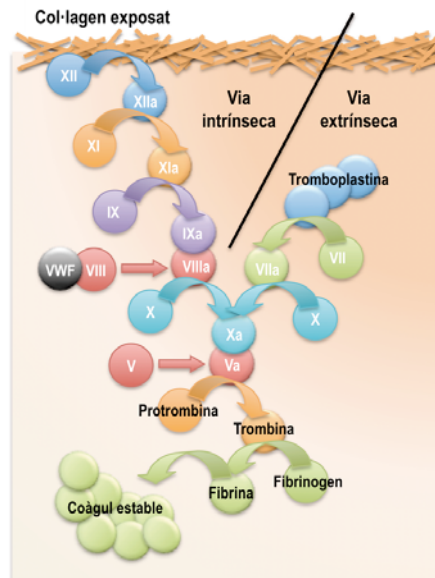


Figura 9: Esquema de l'hemostàsia secundària. Cascada de coagulació amb els factors plasmàtics implicats.

VWF i el FVIII són sintetitzats per diferents tipus de cèl·lules [Lenting et al. 1998] i, durant o després de la seva alliberació a la circulació, aquestes proteïnes formen un complex no covalent. En els dominis D' i D3 del VWF, els ponts disulfur mantenen la conformació tridimensional adequada per a la seva unió amb el FVIII. Cada monòmer de VWF és capaç d'unir-se a una molècula de FVIII, no obstant, in vivo, només un 1-2% dels monòmers es troba unit al FVIII [Vlot et al. 1995]. El trencament d'un dels punts d'unió del FVIII al VWF produït per acció de la trombina, resulta en la dissociació d'aquest complex i la posterior activació del FVIII (FVIIIa) durant el procés de coagulació [Saenko and Scandella 1997].

Així doncs, els dominis del VWF tenen funcions específiques relacionades amb la dimerització i multimerització així com amb la interacció amb diferents proteïnes relacionades amb l'hemostàsia. Modificacions puntuals en aquests dominis causades per una mutació poden alterar la seva funció específica [Hilbert et al. 1995].

3.3 El VWF i el VWFP

El VWF és un dels gens més grans i complexos descrits fins al moment. Es troba localitzat al braç curt del cromosoma 12 (12p13.2) [Ginsburg et al. 1985; Kuwano et al. 1996], s'estén al llarg de 178 kb i conté un total de 52 exons d'entre 40 i 1.400 bp que codifiquen per un mRNA d'aproximadament 8,7 kb. L'exó 28 és excepcionalment llarg ja que conté 1.379 parells de bases i codifica pel dominis A1 i A2 de la proteïna. És un gen altament polimòrfic donat que s'hi localitzen un total de 102 SNPs a l'mRNA i 2.386 polimorfismes a tot el gen segons la base de dades d'SNPs (Build 132). Existeix un pseudogèn parcial situat al cromosoma 22 (22q11.2) [Patracchini et al. 1989] altament homòleg a la seqüència que comprèn els exons del 23 al 34 del VWF (Figura 10).

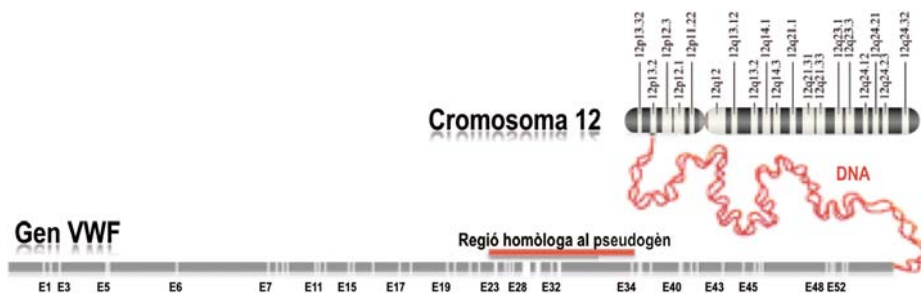


Figura 10: Localització del VWF al cromosoma 12 i organització del gen en 52 exons amb la regió homòloga al pseudogèn marcada en vermell.

El VWFP manca de funció biològica i, al llarg del temps, ha anat acumulant diferents mutacions. El fet que la divergència entre les dues seqüències sigui de només ~3,1% de la seqüència nucleotídica fa pensar que el pseudogèn aparegués, fa relativament poc temps, per una duplicació gènica parcial [Mancuso et al. 1991].

4. Diagnòstic molecular de la malaltia de von Willebrand

4.1 Dificultats diagnòstiques

El diagnòstic molecular de la VWD s'ha vist seriosament compromès degut a la complexitat i la grandària del *VWF*, a l'alta freqüència de noves mutacions, a l'alta homologia que existeix amb el *VWFP* i a la manca de protocols optimitzats per abordar la seqüenciació nucleotídica en gens de gran mida. A més, la penetrància incompleta de la VWD, la variabilitat dels resultats de les proves analítiques utilitzades pel diagnòstic i la necessitat d'un gran nombre de familiars han fet, de l'anàlisi de segregació amb marcadors intragènics del *VWF*, una eina indispensable per als estudis de lligament [Eikenboom et al. 2006]. En aquest sentit, diferents grups d'investigació han realitzat un lloable esforç en el desenvolupament de tècniques alternatives per a la identificació de mutacions. Les aproximacions utilitzades actualment en el diagnòstic molecular de la VWD són diverses: tècniques indirectes o de lligament genètic, tècniques de cribatge de mutacions, seqüenciació directa, etc.

4.2 Tècniques de diagnòstic

Un cop s'ha diagnosticat clínicament un individu afectat per una malaltia hereditària és important estudiar també el gen o gens responsables per tal d'identificar la mutació concreta causant de la patologia. Principalment hi ha dues estratègies diagnòstiques per a l'estudi molecular de les mutacions: les tècniques de diagnòstic indirecte i les de diagnòstic directe.

4.2.1 Diagnòstic indirecte

Aquestes tècniques es basen en l'anàlisi del lligament entre un o més polimorfismes o marcadors i el gen responsable de la malaltia [Pillet and Schorderet 1994]. Donat que aquests polimorfismes poden estar localitzats intragènica o a prop de gens, en individus portadors o afectats de malalties hereditàries, es pot estudiar el patró de

segregació de l'al·lel del polimorfisme que s'hereta conjuntament amb l'al·lel mutant del gen. Aquesta tècnica ens permet detectar, dins d'una família, quins individus són portadors de la malaltia de manera ràpida i fiable per a realitzar el consell genètic [Casals et al. 1996]. Cal destacar que, malgrat és possible realitzar un seguiment del cromosoma portador del gen defectuós, els polimorfismes no tenen cap relació amb el defecte genètic i, per tant, no proporcionen informació sobre el tipus de mutació causant de la malaltia. Hi ha tot un seguit de limitacions inherents a aquesta aproximació, com ara la impossibilitat d'obtenir mostres de parents clau per a l'estudi, els casos esporàdics en els quals l'absència d'història familiar per la malaltia no permet determinar el cromosoma afectat, el risc de recombinació entre el marcador i el gen afectat i la manca d'informativitat dels marcadors utilitzats [Goodeve 1998]. Els marcadors que es fan servir per a la realització d'anàlisis indirectes són loci polimòrfics, el que vol dir que presenten com a mínim dos al·lells amb freqüències superiors a l'1% en els individus d'una població. S'han descrit diferents tipus de polimorfismes en humans, com són els d'un únic nucleòtid o SNP, els microsatèl·lits o STRs i els minisatèl·lits o VNTR. Els SNPs són substitucions d'un sol nucleòtid que poden estar en regions no codificants o als exons dels gens i que, a causa de la degeneració del codi genètic, no impliquen un canvi en l'aminoàcid que codifiquen o, si aquest canvia, la funció de la proteïna resultant no queda afectada. Les STRs o microsatèl·lits són repeticions consecutives d'una seqüència bàsica de 2 a 6 nucleòtids. A partir de 7 nucleòtids ja s'anomenen VNTR o minisatèl·lits. Els microsatèl·lits són seqüències de DNA generalment ubicades en regions no codificants repartides per tot el genoma, el nombre de repeticions de les quals és hipervariable entre individus i propi per a cada persona (*DNA fingerprinting*).

En el cas de la VWD, s'han descrit diferents polimorfismes del tipus STR situats intragènicaament al *VWF*. Els més utilitzats en diagnòstic són els situats a l'intró 40 del *VWF*, on existeix una regió polimòrfica amb tres loci que es coneixen com a VNTR1, VNTR2 i VNTR3 [Pena et al. 1994; Ni et al. 2000]. Una altra STR utilitzada és la localitzada a la regió del promotor del *VWF*, coneguda com a VWP i que consisteix en

INTRODUCCIÓ

la repetició d'un dinucleòtid (GT) [Zhang et al. 1992]. Aquests quatre marcadors intragènics s'utilitzen actualment per al diagnòstic indirecte de la VWD donat que ofereixen una elevada informativitat en ser analitzats conjuntament (Figura 11) [Vidal et al. 2005]

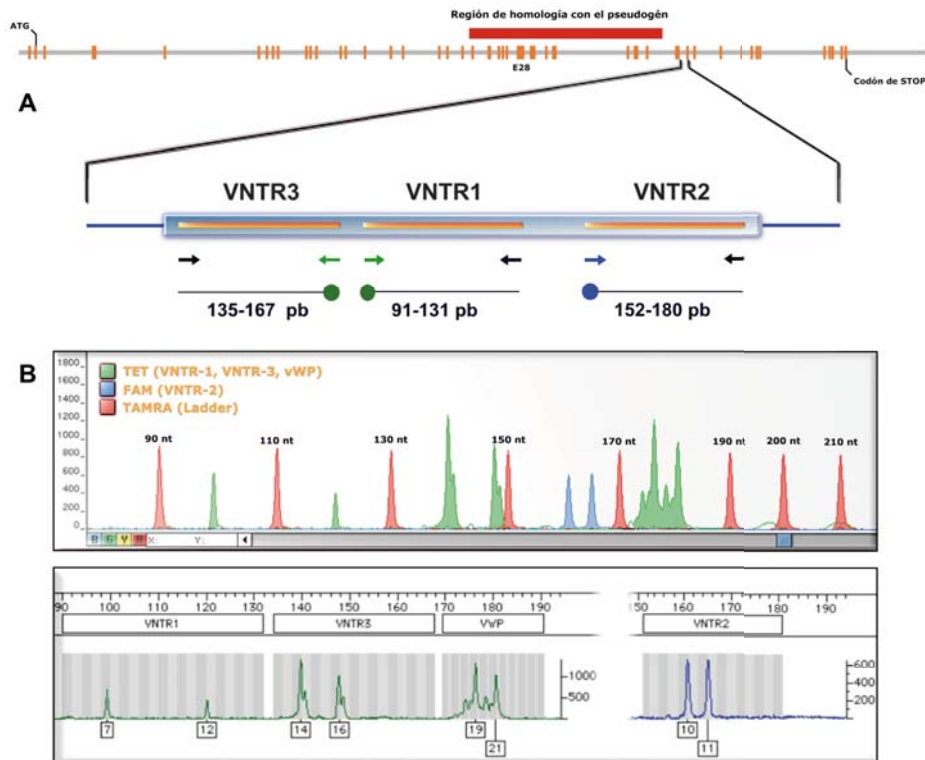


Figura 11: A. Representació esquemàtica de la posició de les STRs localitzades a l'intró 40 del gen i la mida esperada dels productes de la PCR. B. Electroferograma d'una mostra representativa incloent el marcador de 50-500 DNA TAMRA-labeled en vermell. A sota, visualització amb el programa Genotyper aplicant una plantilla específica per l'anàlisi simultani de les quatre STRs amb la identificació del polimorfisme per a cada al·lel. Adaptada de [Vidal et al. 2005].

Aquesta tècnica té una aplicació complementària en l'estudi de famílies de tipus 1 en les que no s'ha pogut establir una associació entre la clínica i el VWF en estudis de lligament. Per aquesta raó, els mètodes indirectes utilitzant un o més marcadors polimòrfics descrits al llarg del VWF segueixen sent una eina de gran valor per a realitzar estudis de lligament ja sigui per confirmar un diagnòstic o per descartar famílies amb símptomes del tipus de la VWD que no es troben associats amb anomalies al VWF.

4.2.2 Diagnòstic directe

Es basa en la detecció de la mutació responsable de la malaltia. Les diferents tècniques que s'utilitzen es poden agrupar en:

- **Cribatge de mutacions.** S'han descrit diferents tècniques, que tenen com a últim objectiu analitzar regions o fragments amplificats del gen de manera que alguna característica físico-química permeti diferenciar entre un fragment gènic control i un fragment que contingui una alteració puntual. Totes elles tenen la peculiaritat en comú que, després d'analitzar els diferents fragments i identificar els suposats portadors d'una mutació, aquests han de ser seqüenciats per confirmar l'existència de l'alteració i determinar si aquesta pot ser responsable de la patologia. S'han descrit diferents mètodes per a detectar variacions de seqüència de grans gens:

Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP) es basa en la migració electroforètica diferencial de les seqüències de DNA de cadena senzilla a les quals, mutacions puntuals alteren la seva estructura [Orita et al. 1989; Keeney et al. 1999].

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) es un protocol on els fragments de DNA són separats en gels desnaturitzants en gradient d'urea/formamida. Les variacions entre seqüències homòlogues produeixen diferències en la seva temperatura de fusió i canvis de mobilitat en aquest tipus de gels [Fischer and Lerman 1980; Fischer and Lerman 1983; Ribba et al. 1991]

Conformational Sensitive Gel Electrophoresis (CSGE) és una tècnica basada en la detecció de molècules heterodúplex formades per la hibridació entre un DNA control i el seu homòleg portador d'una mutació. Aquestes molècules presenten una mobilitat electroforètica aberrant que permet diferenciar-les en gels desnaturitzants [Ganguly et al. 1993; Hashemi Soteh et al. 2007].

Denaturing High Performance Liquid Chromatography (dHPLC). Les molècules heterodúplex presenten temps de retenció diferents de les seves homòlogues homodúplex quan són sotmeses a cromatografia líquida en fase reversa en gradient continu d'acetonitril. Aquest comportament permet identificar els potencials fragments portadors de l'alteració per al seu posterior anàlisi [Oefner et al. 1994; Kakela et al. 2006]

Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) es basa en la diferència existent entre dues o més molècules de DNA homòlogues digerides per enzims de restricció. Els fragments resultants són separats en funció de la seva longitud per electroforesi en gel i la identificació del fragment portador es dona quan la seva longitud varia respecte la del control [Ahmad et al. 2009; Ota et al. 2009].

Totes aquestes tècniques s'han aplicat al diagnòstic molecular de la VWD a pesar que la naturalesa altament polimòrfica del VWF (amb una elevada freqüència d'SNPs) té un efecte negatiu en l'eficiència de les estratègies d'screening per a la identificació de les mutacions responsables de la malaltia. A més, aquestes tècniques impliquen un considerable esforç de manipulació i personal molt qualificat.

- **Seqüenciació directa.** Aquesta aproximació és la més senzilla conceptualment ja que consisteix en la lectura directa del gen o gens associats a la patologia mitjançant la determinació de la seva seqüència de nucleòtids a les regions considerades com a rellevants com són exons, regions intròniques flanquejants i regions implicades en la regulació de l'expressió [Costa et al. 2000]. A més, aquesta tècnica proporciona una informació molt valuosa d'interès bàsic i aplicat (polimorfismes, freqüència de mutacions i la seva relació amb la manifestació clínica, implicació d'àrees gèniques concretes en aspectes funcionals de la proteïna que codifiquen, etc). Donat que els avantatges que aporta són evidents, la seqüenciació directa és la millor de les tècniques que poden aplicar-se per a la

identificació de mutacions i actualment s'utilitza en el diagnòstic de nombroses malalties hereditàries.

4.3 Estratègies de seqüenciació

4.3.1 Seqüenciació tradicional

Es basa en el mètode descrit per Sanger [Sanger et al. 1977]. La síntesi de les cadenes complementàries es dona per la DNA polimerasa utilitzant dNTPs i la terminació de la síntesi amb ddNTPs marcats fluorescentment. Aquests ddNTPs es caracteritzen per la manca d'un dels dos grups hidroxil de manera que, quan un d'aquests nucleòtids s'incorpora a una cadena de DNA en creixement, no pot continuar l'elongació ja que la DNA polimerasa necessita un extrem 3'-OH per afegir el següent nucleòtid. L'electroforesi capil·lar és el mètode més habitual per a la separació dels fragments. Un làser integrat en el seqüenciador excita els fluorocroms i la llum emesa és detectada per una càmera CCD que discrimina el color de la fluorescència i identifica el nucleòtid corresponent. En el cas del *VWF*, la complexitat i grandària d'aquest gen ha dissuadit molts laboratoris de la utilització de la seqüenciació sistemàtica com a mètode de diagnòstic molecular [Hashemi Soteh et al. 2007].

4.3.2 Noves plataformes de seqüenciació massiva.

L'aparició de noves tecnologies de seqüenciació en els darrers anys, anomenades NGS, permeten la seqüenciació massiva del DNA i són fins a 200 vegades més ràpides i econòmiques que la seqüenciació de Sanger tradicional [Metzker 2010]. La capacitat d'aquestes plataformes es fa evident amb la seva aplicació al desenvolupament de dos grans projectes: 1.000 genomes, amb l'objectiu d'establir el catàleg més detallat sobre la variació genètica humana [Pennisi 2010], i el projecte Exoma (<http://exome.gs.washington.edu>), amb l'objectiu de validar el balanç cost-eficiència i la capacitat de la NGS per a l'anàlisi de totes les regions codificants del genoma humà. Aquestes plataformes utilitzen diferents estratègies, però totes elles es basen en la

INTRODUCCIÓ

preparació de llibreries, seqüenciació, captura d'imatge d'alta resolució i anàlisi de dades (Taula 1). Una característica comú d'aquestes plataformes és que aleatòriament trenquen el DNA en fragments més petits a partir dels quals es creen les llibreries que són adherides o immobilitzades en una superfície o suport sòlid i que permeten milions de reaccions de seqüència de forma simultània.

Taula 1: Comparació de mètodes i resultats entre les diferents NGS. Modificat de [Metzker 2010].

Plataforma	Amplificació	Seqüenciació	Gb/run	Temps per run	Longitud lectura	Avantatges	Desavantatges
454-FLX	PCR d'emulsió	Piroseqüenciació	0,45	8,4 h	330 bp	Lectures més llargues i runs més ràpids	Cost dels reactius i errors en regions d'homopolimers
Illumina	Amplificació per ponts	Seqüenciació per sínetsi	18	4 dies	75-100 bp	La plataforma més utilitzada	Baixa capacitat de multiplexació de mostres
SOLiD	PCR d'emulsió	Seqüenciació per lligació	30	7 dies	50 bp	Capacitat de correcció d'errors	Runs molt llargs

Una de les aplicacions més prometedores d'aquestes plataformes de NGS és la seva aplicació al diagnòstic molecular de malalties monogèniques i poligèniques [Mardis 2008]. Un exemple adequat per a la potencial aplicació d'aquesta tecnologia és la VWD. D'herència complexa i amb un gen implicat de gran mida, el diagnòstic d'aquesta malaltia resultaria clarament beneficiat si es pogués disposar de la seqüència completa del gen de diferents membres de cada família a un cost raonable. Actualment, les tres plataformes més utilitzades són:

- **Roche/454 FLX.** Aquesta plataforma va ser la primera en arribar al mercat (2004). Els fragments de la llibreria es barregen amb boles d'agarosa que porten adherits oligonucleòtids complementaris als adaptadors específics del 454. D'aquesta manera, cada bola s'associa amb un únic fragment i s'aïllen en micelles d'oli individuals que contenen els reactius necessaris per a la PCR (emPCR) obtenint-se aproximadament un milió de còpies de cada fragment de DNA a la seva superfície [Dressman et al. 2003] (Figura 12). Aquestes boles són col·locades en una placa amb centenars de milers de pous individuals, on són retingudes per

separat i cada reacció de seqüència pot ser monitoritzada. La tecnologia que utilitza està basada en la piroseqüenciació, on cada incorporació d'un nucleòtid per la DNA polimerasa allibera un pirofosfat que inicia una sèrie de reaccions que permeten convertir, gràcies a l'acció de la luciferasa, els pirofosfats en llum detectable mitjançant un dispositiu CCD [Margulies et al. 2005]. La quantitat de llum produïda és proporcional al nombre de nucleòtids incorporats.

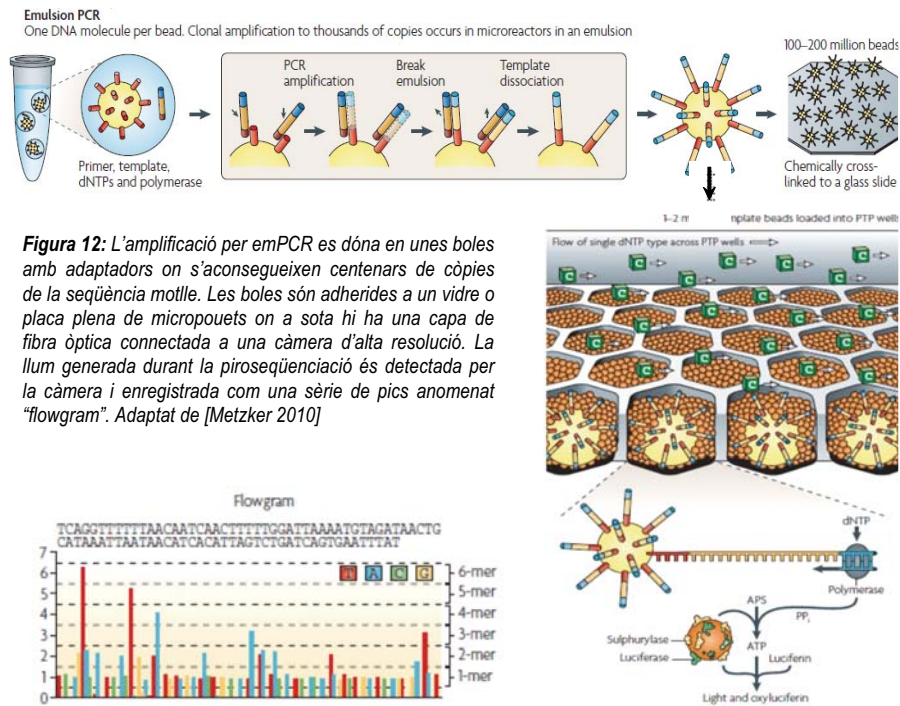
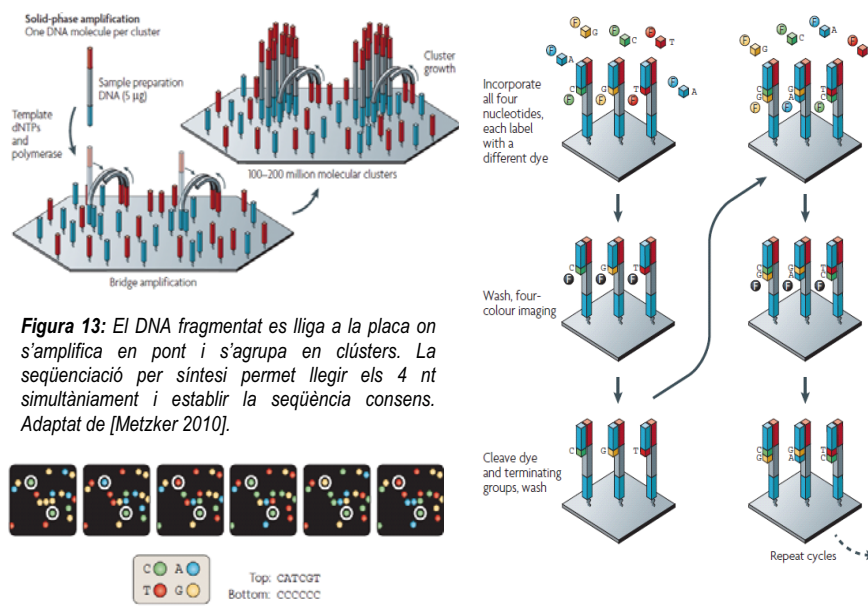


Figura 12: L'amplificació per emPCR es dona en unes boles amb adaptadors on s'aconsegueixen centenars de còpies de la seqüència motlle. Les boles són adherides a un vidre o placa plena de micropouets on a sota hi ha una capa de fibra òptica connectada a una càmera d'alta resolució. La llum generada durant la piroseqüenciació és detectada per la càmera i enregistrada com una sèrie de pics anomenat "flowgram". Adaptat de [Metzker 2010]

- **Illumina/Solexa Genome Analyzer.** Introduït el 2006, aquest sistema es basa en el concepte de "seqüenciació per síntesi" per produir lectures a partir de milions de fragments de DNA amplificats simultàniament [Bentley 2006]. Després de fases de fragmentació i lligació a adaptadors, el DNA s'immobilitza en una superfície sòlida i s'amplifiquen els fragments en pont [Fedurco et al. 2006]. Aquest mètode permet la generació *in situ* de còpies d'una molècula específica de DNA en un suport sòlid (Figura 13). La DNA polimerasa produeix múltiples clústers, cada un dels quals conté al voltant d'un milió de còpies del fragment original per identificar les bases

INTRODUCCIÓ

incorporades amb la intensitat necessària per a detectar-la durant la seqüenciació. El sistema d'Illumina utilitza la seqüenciació per síntesi, en la qual els 4 nucleòtids són afegits simultàniament i, junt amb la DNA polimerasa, incorporats en els clústers adherits a la placa. Cada nucleòtid porta una marca fluorescent específica de manera que la captura de la imatge es realitza després de cada incorporació d'una nova base. Això li confereix una major precisió i, a diferència d'altres plataformes, permet l'anàlisi de seqüències homopolimèriques.



- **Applied Biosystems SOLiD System** (*Sequencing by Oligo Ligation and Detection*). Aquesta plataforma, disponible des de finals del 2007, també utilitza la emPCR però, a diferència de les altres NGS, utilitza un únic procés de seqüenciació catalitzat per la DNA ligasa [Valouev et al. 2008]. Després de la unió d'un encebador universal, es produeix la lligació de sondes marcades que són una barreja d'oligonucleòtids de 9 bases amb dos bases específiques a l'extrem 3' i un marcador diferent per a cada nucleòtid a l'extrem 5', per llegir la fluorescència a cada cicle. Posteriorment, l'oligonucleòtid lligat al fragment es digereix amb un enzim alliberant les últimes 4 bases i s'inicia el cicle següent. Un cop

transcorreguts 10 cicles, s'obté una seqüència de colors espaiada a intervals de 5 bases. Aleshores, es separen els encebadors que s'havien unit a la seqüència i es produeix una segona lligació amb un encebador diferent desplaçat una base respecte l'anterior. Els cicles es repeteixen completant la seqüència amb un nucleòtid més, a l'esquerra de l'anterior.

Una nova tecnologia basada en la seqüenciació d'una única molècula s'està fent lloc dins les plataformes de seqüenciació massiva. Són les anomenades plataformes de "tercera generació" o de "next-next generation". La capacitat d'aquestes plataformes fa que no siguin necessàries amplificacions prèvies degut a que la seqüenciació es dona a partir d'una única molècula. Actualment existeixen tres plataformes d'aquest tipus: HeliScope Helicos BioSciences [Pushkarev et al. 2009], Pacific Biosciences [Korlach et al. 2010] i Nanopore IBM [Luan et al. 2010]. Aquesta tecnologia encara és incipient i no hi ha plataformes disponibles al nostre país, però s'anticipa que seran més ràpides i econòmiques i menys laborioses que les tecnologies de NGS actualment disponibles [Gupta 2008].

5. Mutacions al *VWF*

Hi ha molts tipus d'anomalies genètiques associades a la VWD. La majoria d'aquestes mutacions es presenten a d'altres trastorns d'origen hereditari, mentre que algunes resulten de les característiques particulars del *VWF* [Goodeve 2010]. Els tipus de mutacions més destacables són:

- **Transcripcionals.** La síntesi de l'mRNA requereix de la unió d'una sèrie de factors transcripcionals a seqüències específiques del promotor del *VWF*. Mutacions en aquestes seqüències poden provocar la reducció o l'absència de transcripció de l'RNA de l'al·lel afectat [Othman et al. 2005].

INTRODUCCIÓ

- **Canvi de sentit.** El canvi d'un aminoàcid per un altre pot alterar l'estructura o la funció del VWF. Aquestes substitucions, que són el tipus de mutació més freqüent, poden trobar-se al llarg de tot el VWF i causar qualsevol tipus de VWD, sent predominants en els tipus 1 i 2 [Goodeve 2010].
- **Sense sentit.** També anomenades de parada, aquestes mutacions poden provocar la degradació de l'mRNA per un mecanisme anomenat NMD. Aquest procés elimina l'mRNA aberrant, on s'ha generat un PTC, limitant la producció de proteïna truncada [Silva and Romao 2009]. L'eficiència de l'NMD no és igual per a totes les mutacions sense sentit, ni en tots els tipus cel·lulars i, en alguns casos, es poden arribar a formar proteïnes aberrants [Plate et al. 2010].
- **Petites delecions, insercions o duplicacions.** Les duplicacions són còpies de seqüències curtes properes, i les insercions i delecions solen afectar a un o pocs nucleòtids que poden trobar-se en seqüències repetitives [Ball et al. 2005]. Aquestes mutacions provoquen un canvi en la pauta de lectura que suposa la formació d'un PTC després de més o menys aminoàcids aberrants.
- **Grans delecions.** Poc comuns a la VWD, les grans delecions poden derivar de recombinacions on poden estar implicades seqüències Alu [VWFdb 2010]. Com en el cas anterior, la majoria provoquen canvis a la pauta de lectura, però la deleción pot fer-se dins del marc de lectura i únicament provocar la pèrdua d'alguns aminoàcids.
- **Conversió gènica.** Aquestes mutacions són el resultat d'un procés de recombinació entre el VWF (cromosoma 12) i el VWFP (cromosoma 22) [Chen et al. 2007], que es veu afavorit per la gran homologia que existeix entre les dues seqüències així com per la presència d'unes seqüències anomenades *chi-like* que poden promoure la recombinació entre gens de, fins i tot, cromosomes diferents [Eikenboom et al. 1994; Gupta et al. 2005] (Figura 14). Aquestes substitucions, que

imiten la seqüència del pseudogèn, són una causa força comú de la VWD. Donat que la seqüència entre el gen i el pseudogèn varia en uns pocs nucleòtids, l'extensió de la conversió només pot ser estimada i pot donar diferents fenotips depenent de la longitud de la conversió i de si es troba en homozigosi o heterozigosi [Gupta et al. 2005]. Les mutacions més comuns degudes a aquest mecanisme són P1266L en el tipus 2B, Q1311X en el tipus 3 i V1279I en els tipus 1 i 2M de la VWD [James et al. 2007; Federici et al. 2009; VWFdb 2010]

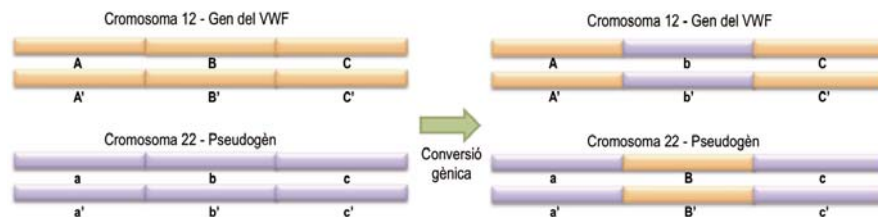


Figura 14: La conversió gènica suposa la recombinació entre el gen i el pseudogèn.

- **En potencials llocs d'*splicing* (PSSM).** Existeixen evidències que tots els tipus de modificacions nucleotídiques poden ser deletèries i poden afectar el processament normal del pre-mRNA per disrupció de les seqüències consens d'*splicing* o per la creació de seqüències críptiques d'*splicing* [Houdayer et al. 2008]. Quan aquestes mutacions afecten els dinucleòtids GT i AG dels extrems 5' i 3' de cada intró, el seu efecte és clar ja que poden suprimir el reconeixement dels exons i alterar el mecanisme d'*splicing*. Les conseqüències d'aquest procés solen ser la pèrdua d'exons o la retenció dels introns. Mutacions allunyades dels dinucleòtids GT i AG poden reduir l'*splicing* normal, però no eliminar-lo, fent que la transcripció resulti en una varietat de diferents trànscrips aberrants i correctes [Goodeve 2010]. Amb l'anàlisi de l'mRNA de plaquetes de pacients es pot estudiar com les PSSM afecten a la transcripció del VWF [Gallinaro et al. 2006].

5.1 Estudis per identificar l'efecte de les mutacions

En els últims anys, degut a les millores en les tecnologies de seqüenciació, s'ha produït un augment en el nombre de mutacions identificades que no s'havien descrit prèviament. Un dels principals objectius del diagnòstic molecular és la correcta interpretació de les conseqüències biològiques de les noves variants de seqüència i el seu possible impacte en el processament de la proteïna. Les aproximacions més utilitzades són la realització de prediccions mitjançant anàlisis *in silico*, estudis d'*splicing* *in vivo* i estudis funcionals *in vitro*.

5.1.1 Anàlisis *in silico*

Existeixen diferents algorismes predictius que poden aplicar-se en l'anàlisi de les mutacions d'interès mitjançant programes bioinformàtics disponibles a Internet i que poden aportar informació molt útil de forma ràpida abans d'iniciar estudis en profunditat de les mutacions. En el cas de les substitucions en regió codificant, l'objectiu d'aquestes anàlisis és establir el grau de variació tolerada en presència d'un nucleòtid diferent. Per tal de valorar l'efecte d'aquestes mutacions poden utilitzar-se, entre d'altres, els programes SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant, <http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>) [Ng and Henikoff 2002] i PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>) [Ramensky et al. 2002]. Aquests programes prediuen el possible impacte de la substitució d'un aminoàcid a l'estructura i funció d'una proteïna humana basant-se en l'alineació de múltiples seqüències. El programa PolyPhen, a més, utilitza paràmetres estructurals per avaluar l'efecte de la substitució [Ramensky et al. 2002]. En el cas de les PSSM, les mutacions que afecten els dinucleòtids GT de l'extrem 5' i AG de l'extrem 3' dels introns, pel fet que eviten el correcte reconeixement dels exons, tenen un clar efecte en el processament de l'mRNA. Tot i això, qualsevol modificació nucleotídica ha de considerar-se una candidata potencial a alterar l'*splicing* ja que no només les situades a les seqüències consens GT i AG, sinó que tant les mutacions sinònimes com qualsevol mutació intrònica poden modificar aquest procés [Zatkova et al. 2004; Dehainault et al. 2007].

Per predir l'efecte de les PSSM, alguns dels programes més utilitzats són el NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2>) [Brunak et al. 1991], GeneSplicer (http://cbb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml) [Perteau et al. 2001], BDGP (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) [Reese et al. 1997], Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF>) [Desmet et al. 2009]. Aquestes eines d'anàlisi són especialment útils per predir els efectes de les PSSM, sobretot quan l'NMD dificulta el desenvolupament d'estudis a nivell de l'mRNA de la regió afectada. Degut a que aquest tipus d'eines utilitzen algorismes basats en diferents paràmetres, en ocasions poden donar lloc a resultats discrepants. Per aquest motiu és fonamental utilitzar diferents eines simultàniament per poder predir els efectes de les mutacions [Houdayer et al. 2008]. És important destacar que la interpretació dels resultats dels programes de predicció *in silico* no pot utilitzar-se per decidir si una variació de seqüència identificada en un pacient és o no és responsable de la malaltia sense altres evidències [Tchernitchko et al. 2004].

5.1.2 Anàlisis *in vivo*

Les mutacions sense sentit i aquelles que alteren la pauta de lectura com ara les insercions i les delecions, tenen un clar efecte sobre la funcionalitat de la proteïna. Contràriament, les PSSM tenen un efecte menys previsible i els estudis *in vivo* a partir de l'mRNA dels pacients són la millor manera d'interpretar les conseqüències d'aquestes mutacions [Bell 2007] que poden afectar la reorganització de l'mRNA i introduir codons de parada prematurs en els transcrits. Aquests PTCs són reconeguts i eficientment degradats per la cèl·lula en un procés conegut com a NMD [Byers 2002] per controlar la síntesi de proteïnes truncades que poden ser nocives per la cèl·lula [Lewis et al. 2003]. Tot i ser un tipus de mutació força comú al *VWF*, a la base de dades internacional només trobem 26 PSSM de les quals, en només 6 s'han realitzat estudis a nivell d'RNA per esclarir els seus efectes [Mertes et al. 1994; Cumming et al. 2006; Goodeve et al. 2007].

5.1.3 Anàlisis in vitro

Els estudis funcionals són el millor mètode per determinar l'efecte de les mutacions i confirmar la seva patogènia. Per poder estudiar l'efecte que produeixen les mutacions identificades en els pacients, es realitza la mutagènesi dirigida per obtenir el cDNA del gen d'interès amb la mateixa alteració. Aquest cDNA es pot expressar in vitro en diferents tipus cel·lulars, però és important que l'assaig es desenvolupi en un sistema adequat donat que aquestes anàlisis són molt específiques del gen i la malaltia. Per a la VWD, els tipus cel·lulars més utilitzats són COS-7 [Hilbert et al. 2004; O'Brien et al. 2004], AtT-20 [Berber et al. 2009], 293 EBNA i HEK293 [Castaman et al. 2010]. Algunes de les anàlisis desenvolupades per a l'estudi de mutacions al *VWF* s'han realitzat per estudiar el transport cel·lular i la sensibilitat a l'ADAMTS-13 en mutacions de tipus 2A [O'Brien et al. 2004], la capacitat d'unió a receptors plaquetaris [Vasudevan et al. 2000] o la capacitat d'unió al FVIII en mutacions de tipus 2N [Hilbert et al. 2004].

5.2 Registres de mutacions

Les bases de dades de mutacions en gens humans han adquirit una gran importància en totes les àrees sanitàries. Gràcies a les tècniques de seqüenciació, cada cop més avançades, s'ha pogut portar a terme el diagnòstic molecular d'un gran nombre de malalties genètiques [Rob Elles 2004]. Aquests estudis aporten dades contínuament i diferents centres han anat recopilant les mutacions identificades al seu gen d'interès i compilant-les en bases de dades específiques per a aquest gen. Aquestes bases solen ser d'accés gratuït per Internet i contenen tanta informació específica sobre el gen, la malaltia, les mutacions identificades i les publicacions on es descriuen, que fa que es coneguin com a "bases de coneixement" [Claustres et al. 2002]. La major part d'aquestes bases de dades es troben registrades per la *Human Genome Variation Society* (HGVS) que, a més, elabora recomanacions per a la nomenclatura de les variacions gèniques i guies sobre el contingut de les bases de dades.

5.2.1 ISTH-SSC VWF online database

Aquest és el nom de la base de dades de la Societat Internacional de Trombosi i Hemostàsia per mutacions al VWF. Es tracta d'un registre internacional accessible des de la pàgina <http://www.shef.ac.uk/vwf> que es compona de les entrades presentades per investigadors d'arreu del món. Es va crear el 1993 quan existien més de 20 classificacions diferents per a la VWD [Ginsburg and Sadler 1993; Sadler and Ginsburg 1993]. Al llarg dels últims anys, s'ha realitzat un progrés considerable cap a la comprensió de la VWD a nivell molecular. S'hi troben continguts com ara la classificació de la VWD, els polimorfismes descrits, enllaços directes a les seqüències del VWF en diferents organismes, nomenclatura i esquemes del gen i l'mRNA, així com les referències on s'han publicat les mutacions i els polimorfismes. Avaluant el contingut del registre de mutacions, la freqüència relativa corresponent als diferents tipus de la malaltia no es correspon amb les seves freqüències a la població i s'observa com, per exemple, les mutacions responsables de la VWD de tipus 1 es troben poc representades a la base de dades (Figura 15).



Figura 15: Mutacions identificades per a cada tipus de VWD a la Base de Dades Internacional ISTH. Gràfica del contingut de la base de dades del 15-04-2010.

En un total de 526 mutacions descrites, tot i que la VWD de tipus 1 representa gairebé el 75% del total de les famílies, només trobem 164 mutacions d'aquest tipus (31,17%), la majoria de les quals són substitucions de canvi de sentit o PSSM que es troben

INTRODUCCIÓ

repartides per tot el gen. Les mutacions de tipus 2, en canvi, representen el 50% del total de les mutacions descrites. Això es deu al fet que els defectes moleculars en els tipus de VWD 2A, 2B i 2M es troben localitzats a l'exó 28 que és el més gran i representa el 14% de la regió codificant. Les mutacions 2N es localitzen al domini D' i es troben en homozigosi o en heterozigosi composta amb altres mutacions. Trobem 115 mutacions de tipus 3 de les quals 42 són petites insercions o delecions, 12 són PSSM i trobem 35 mutacions sense sentit. Moltes d'elles es troben en homozigosi deguda a consanguinitat entre progenitors. El treball de molts laboratoris ha estat posar a punt la seqüenciació de l'E28 per a la identificació de la mutació en pacients amb defectes qualitius, el que ha permès la caracterització d'un gran nombre de pacients de tipus 2 i fa que, gairebé la meitat de les mutacions identificades (223 registres), es localitzin a l'exó 28. Al nostre país, el diagnòstic molecular de la VWD segueix sent una assignatura pendent com demostra el fet que a la base de dades només hi trobem 18 mutacions descrites en laboratoris espanyols (dades d'abril de 2010).

5.3 Contribució dels estudis multicèntrics a l'epidemiologia molecular de la VWD

Aquests estudis representen les contribucions més rellevants al coneixement de les característiques moleculars d'aquesta malaltia. El reclutament de les famílies es realitza a partir de diferents centres amb una extensa experiència en el diagnòstic de la VWD, el que permet recopilar informació de la població de diferents punts geogràfics per a una caracterització més homogènia de l'epidemiologia de la VWD.

5.3.1 VWD tipus 1

Tres estudis multicèntrics han permès la caracterització de 305 casos índex amb VWD de tipus 1 en 2 anys. L'estudi europeu *Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of type 1 VWD* (MCMDM-1 VWD) que incloïa nou països europeus [Goodeve et al. 2007], un estudi canadenc amb 13 centres implicats [James et al. 2007] i un del Regne Unit, *United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organization*

(UKHCDO) [Cumming et al. 2006] han ampliat de forma considerable el coneixement sobre les bases moleculars de la VWD de tipus 1, molt limitat abans del 2006. Els criteris per a la inclusió dels pacients estaven basats en les guies sobre VWD del *Scientific and Standardization Committee* de la *International Society on Thrombosis and Haemostasis* (ISTH-SSC) utilitzades aleshores [Sadler et al. 2006]. Els canvis identificats comprenen mutacions de canvi de sentit (70%), PSSM (9%), de transcripció (8%), petites delecions (6%), mutacions sense sentit (5%) i petites insercions o duplicacions (2%). De les mutacions de canvi de sentit, unes 8 són el resultat de probables conversions gèniques (3%) [Goodeve et al. 2007; James et al. 2007]. Als estudis europeus i canadencs, un 15% dels casos índex presenten més d'una mutació i la substitució Y1584C és la mutació més comú associada a la VWD de tipus 1 en els tres estudis, sent identificada en el 13% dels casos índex. Una publicació anterior havia demostrat l'origen ancestral comú d'aquesta mutació en diferents pacients donat que totes les famílies presentaven els mateixos marcadors [O'Brien et al. 2003].

5.3.2 VWD tipus 2

S'han realitzat pocs estudis poblacionals a la VWD de tipus 2, però n'hi ha dos d'especial rellevància. El 1997, un estudi francès va identificar 150 mutacions en pacients amb dèficits qualitius de VWF [Meyer et al. 1997] i, el 2009, va aparèixer un nou estudi sobre 67 casos de VWD de tipus 2B [Federici et al. 2009]. Aquests estudis, junt amb d'altres amb pocs pacients implicats i aquelles mutacions no publicades que es recullen a la base de dades internacional, ens ajuden a entendre la patogènesi de la VWD de tipus 2. En el tipus 2A, les proporcions de mutacions identificades per dominis són del 82% als dominis A, del 8% al D2, del 8% a l'extrem carboxi-terminal i de l'1% al D3. En el tipus 2B, destaca el fet que totes les mutacions identificades a la base de dades internacional i a l'estudi francès es localitzen únicament en 16 aa diferents. Pel tipus 2M, la majoria de mutacions són substitucions amb canvi de sentit o delecions que conserven la pauta de lectura i es localitzen a l'exó 28, entre els codons 1.266 i 1.467. L'estudi de Meyer et al. [Meyer et al. 1997] recull un total de 51 mutacions de tipus 2N en pacients francesos. El 49% eren homozigots per a una única mutació, 12%

INTRODUCCIÓ

heterozigots compostos per a dues mutacions diferents de tipus 2N i el 39% eren heterozigots compostos per a una mutació de tipus 2N i una segona mutació. Els exons 18-20, que componen el domini D' contenen el 85% de totes les mutacions identificades com a 2N, la resta es localitzen als exons 17, 24, 25 i 27 [VWFdb 2010]. El diagnòstic molecular en la VWD de tipus 2 és molt útil donat que les diferències entre els seus subtipus requereixen d'un estudi fenotípic complet i una anàlisi de multimers de qualitat [Goodeve 2010].

5.3.3 VWD tipus 3

Per a la VWD de tipus 3, en un estudi sobre quatre cohorts de més de 20 individus cadascuna s'han identificat un 92% de 111 casos [Zhang et al. 1994; Gupta et al. 2008; Sutherland et al. 2009] i, en un estudi de 40 pacients, s'han caracteritzat el 100% de les mutacions [Baronciani et al. 2003]. A la base de dades internacional les entrades comprenen mutacions sense sentit (31%), petites delecions (18%), grans delecions (12%), PSSM (11%) i petites insercions (10%). Les mutacions de canvi de sentit representen al voltant del 18% i provoquen defectes en la dimerització o multimerització del VWF i la seva retenció dins la cèl·lula. Al voltant del 20% de les mutacions es troben a l'exó 28 i la resta es distribueixen al llarg de tot el gen, des de l'exó 3 al 52.

L'anàlisi genètica dels pacients amb VWD és útil tant per a establir el diagnòstic com per identificar el tipus de la malaltia. Les correlacions entre genotip i fenotip incrementen la informació per al tractament i el consell genètic dels pacients. D'aquí la importància d'aquests estudis a nivell poblacional.

Objectius

Les grans idees són aquelles de les quals l'únic que ens sorprèn és que no se'ns hagin ocorregut abans

Noel Clarasó Serrat



Objectius



L'objectiu global del treball ha consistit en aprofitar els avenços en les tecnologies de seqüenciació i d'anàlisi per dissenyar i desenvolupar estratègies per al diagnòstic molecular de la VWD. Es pretén que la identificació de les mutacions responsables permeti realitzar un diagnòstic més precís i progressar a nivell assistencial aprofundint en l'epidemiologia molecular d'aquesta coagulopatia. Els objectius concrets es poden desglossar en:

- Dissenyar i optimitzar un procediment que permeti el diagnòstic molecular de la VWD per seqüenciació directa del *VWF*.
- Realitzar el seguiment clínic i la recollida de mostres de les famílies diagnosticades de VWD a la Unitat d'Hemofília de l'Hospital de la Vall d'Hebron, centre de referència de coagulopaties congènites de Catalunya. Desenvolupar estudis de lligament del *VWF* i associació amb la VWD en pacients i familiars.
- Elaborar una base de dades que reculli la informació generada a partir de l'estudi molecular dels pacients, els paràmetres clínics i les dades del laboratori d'hemostàsia.
- Avaluar l'impacte funcional de les noves mutacions mitjançant anàlisis in silico.

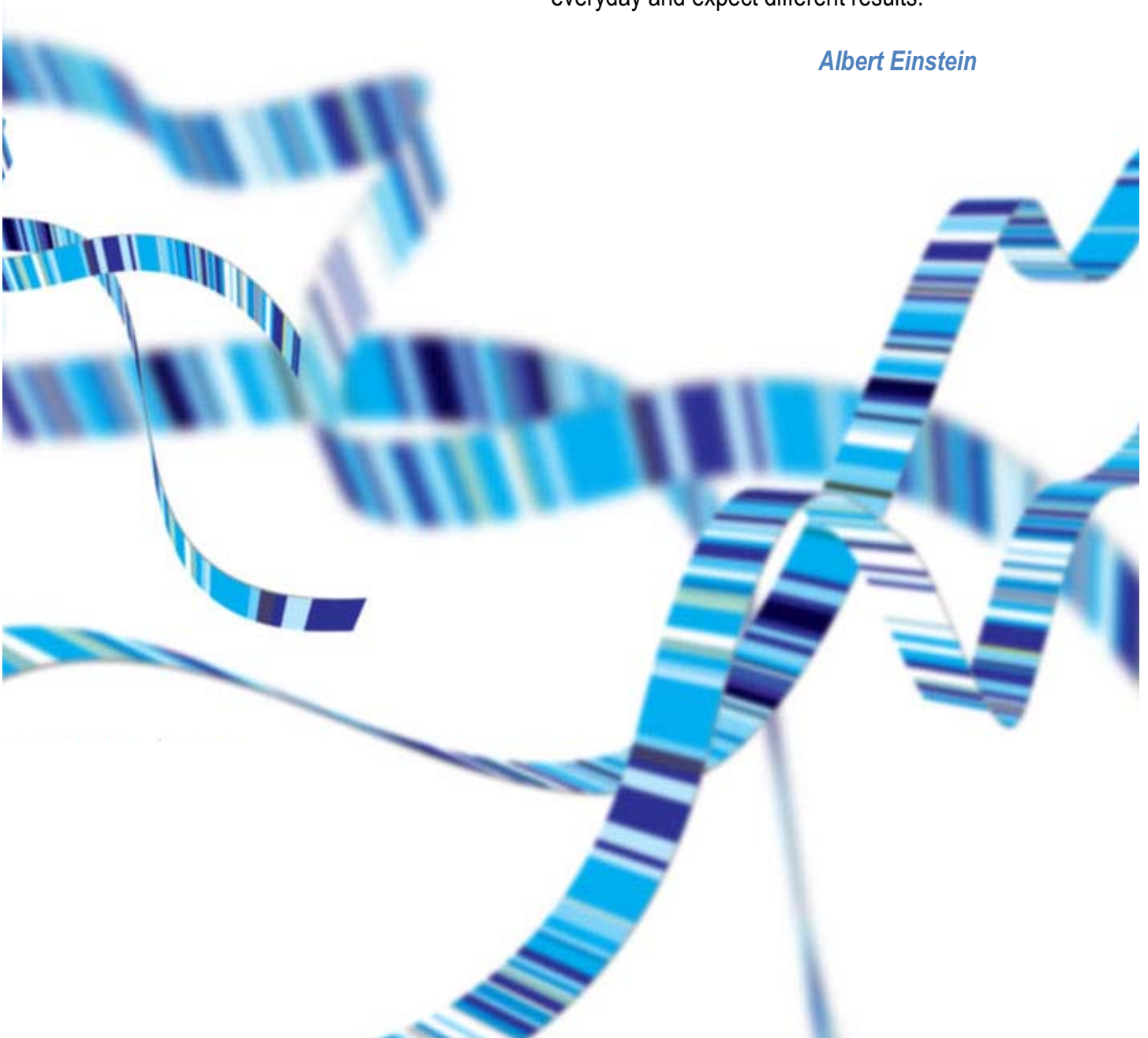
OBJECTIUS

- Aprofundir en l'estudi de determinades mutacions desenvolupant estudis in vivo que ens permetin esclarir els seus efectes en el processament de l'mRNA.
- Estudiar la viabilitat de diferents estratègies per aplicar les noves tècniques de seqüenciació massiva al diagnòstic molecular del VWF. Avaluat la capacitat d'aquestes plataformes per analitzar un gran nombre de pacients i familiars.

Resultats

You can't keep doing the same thing everyday and expect different results.

Albert Einstein



Article 1



Títol

Rapid molecular diagnosis of von Willebrand disease by direct sequencing. Detection of 12 novel putative mutations in VWF gene.

Autors

Irene Corrales, Lorena Ramírez, Carme Altisent, Rafael Parra i Francisco Vidal

Referència

Thromb Haemost. 2009 Mar;101(3):570-6. PMID: 19277422

Resum

La malaltia de von Willebrand (VWD) és la coagulopatia congènita més freqüent a la població general. El seu diagnòstic molecular és especialment complex donat que el gen del factor de von Willebrand (VWF) és especialment gran i molt polimòrfic. A més, existeix un pseudogèn parcial al cromosoma 22 amb una homologia superior al 96% a la regió del gen que inclou els exons del 23 al 34. Donades aquestes dificultats, no s'ha considerat l'aplicació de l'estudi molecular de la VWD a la rutina de laboratori. Avenços

RESULTATS

recents en les tecnologies de seqüenciació i la bioinformàtica poden convertir la seqüenciació directa de tot el *VWF* en una eina de diagnòstic per a la *VWD*, que és especialment recomanable en els tipus 1 i 3. Aquest estudi presenta un nou procediment optimitzat en el qual totes les regions codificants i les regions intròniques flanquejants del *VWF* de dos pacients són amplificades simultàniament sota les mateixes condicions de termociclat en una placa de PCR llesta per utilitzar. Tot el procés de seqüenciació, des de l'extracció de sang del pacient fins a la identificació de la mutació responsable pot realitzar-se en 24 hores resultant una tècnica simple, versàtil i rentable. Per tal de validar aquest mètode, s'ha realitzat la seqüenciació completa del *VWF* en 21 casos índex incloent-hi 7 de cada tipus de *VWD* i s'han identificat un total de 30 mutacions. Dotze d'aquestes mutacions són noves i inclouen 4 de canvi de sentit, una sense sentit, una inserció, la primera inserció-deleció descrita en el *VWF* i 5 mutacions en potencials llocs d'*splicing* (PSSM). Al nostre entendre, aquest és el protocol més ràpid i eficient dissenyat fins al moment per a dur a terme la seqüenciació completa de tota la regió codificant del *VWF* per al diagnòstic molecular de la *VWD*.

Aportació personal al treball

El treball realitzat ha consistit en posar a punt i optimitzar la tècnica de diagnòstic molecular dissenyant els primers, optimitzant les condicions de PCR, passant la tècnica a format microplaca i dissenyant les plantilles específiques dels programes d'anàlisi de seqüències. Paral·lelament, s'ha realitzat el seguiment clínic i la recollida de dades de les famílies candidates per a la seqüenciació. El resultat de l'aportació personal és el desenvolupament del treball experimental i la obtenció de totes les dades que s'hi presenten.

Material suplementari

Taula suplementària de la publicació

Article 2



Títol

Integration of molecular and clinical data of 40 unrelated VWD families in a Spanish locus-specific mutation database. First release including 58 mutations.

Autors

Irene Corrales, Lorena Ramírez, Júlia Ayats, Carme Altisent, Rafael Parra i Francisco Vidal

Referència

Haematologica 2010 Nov; 95(11):1982-1984. PMID: 20801902

Resum

La malaltia de von Willebrand (VWD) és la coagulopatia congènita més freqüent a la població general. Tot i això, la gran complexitat del *VWF* i la seva mida han fet que no es consideri un gen adequat per al seu estudi molecular com a mètode de rutina en laboratoris de diagnòstic. Així, el disseny i desenvolupament d'una tècnica basada en la seqüenciació completa del gen que ens ha dut a la contínua identificació de mutacions noves i prèviament descrites responsables de la VWD. Amb l'objectiu de recopilar i

RESULTATS

actualitzar totes les dades moleculars produïdes, hem creat una base de dades de mutacions específica per al *VWF*. S'ha dissenyat una pàgina web exclusiva per a la *VWD* que inclou informació sobre la malaltia, la seva classificació i un registre de mutacions del *VWF* que actualment conté 58 mutacions identificades en 40 famílies, 19 de les quals han estat descrites al nostre laboratori per primera vegada. Aquestes mutacions es troben localitzades al llarg de tot el gen i trobem 44 substitucions incloent-hi 5 mutacions sense sentit i 6 mutacions involucrades en una conversió gènica, la primera indel descrita al *VWF*, 2 insercions i 11 mutacions localitzades en potencials llocs d'*splicing*. Totes elles s'han enviat a la base de dades internacional i representen més d'un 10% de les seves entrades. El nostre registre de mutacions del *VWF* a Hemobase inclou material suplementari rellevant relacionat amb el diagnòstic, classificació i herència de la *VWD* i representa una recopilació dinàmica de les mutacions identificades al *VWF* al nostre laboratori presentat en una pàgina web fàcilment accessible per tal de permetre una interpretació entenedora dels seus efectes.

Aportació personal al treball

La creació de la base de dades www.vwf.hemobase.com ha requerit la seqüenciació completa dels casos índex, l'estudi de la presència o absència de la mutació en tots els familiars, l'anàlisi de les STRs per realitzar l'estudi de lligament i el disseny dels arbres familiars. A més ha calgut recopilar tota la informació clínica dels pacients, necessària per a la classificació de la *VWD* i un gran nombre de dades moleculars relacionades amb les mutacions identificades. La meua aportació personal és l'obtenció i recopilació de totes les dades que s'hi presenten així com part del disseny de la pàgina web i alguns dels seus continguts didàctics.

Material suplementari

Figures suplementàries de la publicació

Article 3



Títol

Study of the effect of splicing mutations in the VWF gene using RNA isolated from patient's platelets and leukocytes.

Autors

Irene Corrales, Lorena Ramírez, Rafael Parra i Francisco Vidal

Referència

Journal of Thrombosis and Haemostasis 2011. Acceptat per a la seva publicació.

Resum

Les mutacions de canvi de sentit o sense sentit tenen un clar efecte deleteri sobre la funcionalitat de la proteïna. Tot i això, en el cas de les mutacions que potencialment afecten el processament de l'mRNA o les mutacions en potencials llocs d'*splicing* (PSSM), el seu efecte és menys previsible. En aquests casos, les eines bioinformàtiques poden aportar una valuosa aproximació de les seves conseqüències, però és recomanable l'elaboració d'estudis funcionals in vivo i/o in vitro per poder desxifrar l'efecte real de les variacions detectades. Després de la identificació d'un

RESULTATS

nombre significatiu de PSSM en pacients amb VWD, hem iniciat un estudi sistemàtic dels seus efectes *in vivo* a partir d'RNA extret de plaquetes i leucòcits. Amb aquest objectiu, s'han dissenyat 13 parelles de *primers* que permeten l'amplificació completa del cDNA del *VWF* per RT-PCR en els dos tipus cel·lulars i s'ha identificat l'existència d'un *splicing* alternatiu en leucòcits que produeix la pèrdua dels exons 14 i 15. Aquests *primers* també s'han utilitzat per clarificar les conseqüències en el processament de l'mRNA del *VWF* en l'estudi de 7 PSSM identificades en 4 pacients. D'aquesta manera s'ha pogut observar com les mutacions c.533-2A>G i c.8155+3G>C produeixen la pèrdua d'un exó i que la mutació c.7730-1G>C activa un lloc d'*splicing* alternatiu. El mètode desenvolupat pot estendre's a l'estudi dels efectes patogènics de qualsevol PSSM i la seva implicació en el processament de l'RNA del *VWF*. Donat que l'eficiència del NMD varia segons el tipus cel·lular, l'ús d'RNA provinent de plaquetes i leucòcits per a l'estudi de les PSSM en el *VWF* ofereix resultats complementaris, especialment en aquells casos en els que el NMD succeeix en l'al·lel portador de la mutació.

Aportació personal al treball

El treball realitzat ha consistit en posar a punt i optimitzar el protocols d'obtenció d'mRNA de leucplaquetes i la seqüenciació completa del cDNA del *VWF*. S'han dissenyat els *primers* i optimitzat les condicions d'RT-PCR per a l'amplificació sota les mateixes condicions de termociclat. A més, s'ha creat el disseny de les plantilles específiques pels programes d'anàlisi de seqüències. Per a cada pacient s'ha realitzat l'extracció de l'RNA de leucòcits i plaquetes i s'ha estudiat i analitzat la regió d'interès. El resultat de l'aportació personal és el desenvolupament del treball experimental i la obtenció de totes les dades que s'hi presenten.

Material suplementari

Taula suplementària de la publicació

Article 4



Títol

Next generation sequencing approaches for the molecular diagnosis of von Willebrand disease.

Autors

Irene Corrales, Susana Catarino, Lorena Ramírez, Júlia Ayats, David Arteta, Carme Altisent, Rafael Parra, Francisco Vidal.

Referència

Article en preparació.

Resum

Les perspectives en el diagnòstic molecular de les malalties monogèniques ha canviat dràsticament en els últims anys amb la introducció de les noves tècniques de seqüenciació massiva (NGS). Amb l'objectiu d'aplicar aquestes tecnologies al diagnòstic molecular de la VWD, hem desenvolupat dues estratègies d'enriquiment de les regions d'interès, partint de la condició que puguin ser aplicades a qualsevol de les plataformes de NGS disponibles actualment: i) estratègia d'amplificació de tots els

RESULTATS

exons del *VWF* i les regions intròniques flanquejants mitjançant PCRs curtes; ii) estratègia d'amplificació de la seqüència genòmica del *VWF* per PCRs llargues (LR-PCR). La primera estratègia ha estat adaptada a partir de la tècnica de seqüenciació desenvolupada prèviament per a la seqüenciació del *VWF* [Corrales et al. 2009], els amplimers obtinguts per a cada pacient són combinats en un únic tub i fragmentats per incubació a alta temperatura. Per a la segona aproximació, s'ha dissenyat un nou procediment per a l'amplificació del gen en 14 LR-PCRs que són combinades i fragmentades per nebulització. En ambdues estratègies s'han dissenyat *primers* que permeten l'amplificació específica del *VWF* evitant la contaminació amb seqüències del *VWFP*. Per tal d'obtenir una cobertura uniforme de totes les regions, la concentració dels amplicons és normalitzada abans de ser barrejats per evitar la presència desigual d'uns productes respecte d'altres. La validació d'ambdues estratègies s'ha realitzat en una plataforma d'Illumina-Solexa. La multiplexació de les mostres mitjançant la introducció de seqüències que actuen com etiquetes identificadores permet seqüenciar el *VWF* d'entre 100 i 300 pacients simultàniament, possibilitant la caracterització de la població afectada de forma ràpida i econòmica. Aquest treball pretén demostrar que les NGS podrien eliminar en breu les limitacions de la seqüenciació tradicional per a l'estudi de gens grans i complexos com el *VWF*.

Aportació personal al treball

La feina realitzada inclou un treball inicial de seguiment clínic i selecció dels pacients d'interès. S'ha adaptat el protocol basat en PCRs convencionals als requeriments de les noves plataformes de seqüenciació massiva. Per a la seqüenciació completa del *VWF* per LR-PCR, s'han dissenyat els *primers* i optimitzat les condicions de PCR per a l'amplificació simultània de totes les regions del gen. S'han amplificat pacients amb les dues estratègies, s'han quantificat i normalitzat els productes de PCR mitjançant l'aplicació de diferents tècniques i s'han creat el pools de PCRs. Per a l'estudi de multiplexació, s'ha dissenyat i desenvolupat una estratègia per la seqüenciació completa i simultània del gen del *VWF* de 50 pacients.

Informe del Director



La memòria de la Tesi doctoral "Aplicació de tecnologies optimitzades al diagnòstic molecular de la malaltia de von Willebrand per a l'estudi de la relació genotip-fenotip" es presenta com a compendi de 4 publicacions. La participació de la doctoranda Irene Corrales Insa en cada treball és la que es detalla a continuació:

ARTICLE 1:

Rapid molecular diagnosis of von Willebrand disease by direct sequencing. Detection of 12 novel putative mutations in VWF gene.

Corrales I, Ramirez L, Altisent C, Parra R, Vidal F.

Thrombosis and Haemostasis. 2009;101:570-576. Index d'impacte (2009): 4,451

La doctoranda, Irene Corrales, ha estat la responsable directa de tot el treball experimental realitzat al laboratori de biologia molecular. El seu treball ha consistit en el disseny, posada a punt i optimització d'un procediment per al diagnòstic molecular de la malaltia de von Willebrand mitjançant seqüenciació directa del gen del VWF. Més concretament la seva aportació ha estat fonamental en el disseny de *primers* específics, l'optimització de les condicions de PCR en format microplaca i en la identificació i comprovació de les mutacions mitjançant plantilles dissenyades específicament pels programes d'anàlisi de seqüències. D'altra banda, en col·laboració amb l'equip clínic, ha realitzat el seguiment de les famílies estudiades que es presenten

RESULTATS

a l'article. Finalment, ha portat a terme l'estudi in silico de les noves mutacions identificades. El resultat de la seva aportació personal és el desenvolupament d'un diagnòstic que es pot aplicar de manera rutinària al seguiment i suport clínic de la malaltia amb una clara aplicació des de el punt de vista assistencial i de recerca.

ARTICLE 2:

Integration of molecular and clinical data of 40 unrelated VWD families in a Spanish locus-specific mutation database. First release including 58 mutations.

Corrales I, Ramirez L, Ayats J, Altisent C, Parra R, Vidal F.

Haematologica. 2010. Index d'impacte (2009): 6,416

La doctoranda, Irene Corrales, ha realitzat la major part del treball experimental que apareix en aquest article. El seu treball ha consistit en la seqüenciació completa dels casos índex, en l'estudi de la presència o absència de la mutació en tots els familiars, en l'anàlisi de les STRs per realitzar els estudis de lligament, en l'estudi in silico de les mutacions identificades i en la construcció dels arbres familiars. En col·laboració amb l'equip mèdic ha realitzat el seguiment de les famílies estudiades per tal de recopilar tota la informació clínica i de laboratori dels pacients, necessària per a la classificació en els diferents tipus de VWD. La seva aportació ha permès la creació de la base de dades www.vwf.hemobase.com on ha col·laborat mitjançant el disseny de la pàgina web en la implementació dels seus continguts didàctics i en l'obtenció i recopilació de les dades moleculars relacionades amb les mutacions identificades que s'hi presenten.

ARTICLE 3:

Study of the effect of splicing mutations in VWF using RNA isolated from patients' platelets and leukocytes

Corrales I, Ramirez L, Altisent C, Parra R, Vidal F.

Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2011. Index d'impacte (2009): 6,069

La doctoranda, Irene Corrales, ha realitzat tot el treball del laboratori de biologia molecular i ha contribuït de manera significativa en l'aproximació conceptual per al disseny dels experiments. Concretament, la feina de la Irene Corrales ha consistit en: posar a punt i optimitzar el protocols d'obtenció d'mRNA de leucòcits i plaquetes de pacients. Ha dissenyat els *primers* i optimitzat les condicions d'RT-PCR per a l'amplificació completa sota les mateixes condicions de termociclat seguida de la seqüenciació del cDNA del gen del VWF. Ha analitzat l'expressió del gen en leucòcits i plaquetes de tots els pacients estudiats amb mutacions que potencialment afecten a l'*splicing*. Els resultats dels estudis *in vivo* els ha contrastat amb l'anàlisi *in silico* amb almenys quatre programes basats en algorismes diferents de predicció de l'efecte de les mutacions d'*splicing*. El resultat de la seva aportació és el treball més important a data d'avui en número de mutacions potencialment responsables de defectes en el processament de l'mRNA del gen del VWF. Una de les conseqüències més rellevants del seu treball es l'establiment de que el NMD (*nonsense mediated decay*) és un mecanisme molecular freqüentment implicat en la VWD.

ARTICLE 4:

Next generation sequencing approaches for the molecular diagnosis of von Willebrand disease

Corrales I, Catarino S, Ramirez L, Ayats J, Arteta D, Altisent C, Parra R, Vidal F.

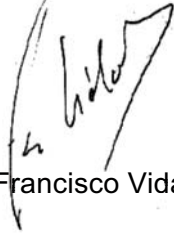
Pendent de publicació, 2011.

La contribució de la Irene Corrales en aquest treball ha estat inicialment i en col·laboració amb l'equip mèdic, el seguiment clínic i selecció dels pacients d'interès per als estudis preliminars i l'estudi pilot. És responsable directe de tot el treball experimental realitzat al laboratori de biologia molecular per a l'adaptació de les PCRs convencionals a les noves plataformes de seqüenciació massiva. D'altra banda, ha dissenyat els *primers* i optimitzat les condicions de LR-PCR per a l'amplificació simultània d'una àmplia regió del gen del VWF. Ha posat a punt i valorat les diferents alternatives en la normalització i fragmentació dels productes de PCR abans de la

RESULTATS

construcció de les llibreries per la seva aplicació a la plataforma de seqüenciació d'Illumina. La construcció de llibreries i la seqüenciació s'ha realitzat en un servei extern i la doctoranda ha participat en l'anàlisi bioinformàtic dels resultats obtinguts. A partir de les conclusions d'aquesta anàlisi, ha dissenyat i desenvolupat un estudi pilot per la seqüenciació completa i simultània del gen del VWF de 50 pacients. El resultat d'aquest treball (en realització en el moment de la presentació de la memòria) permetrà establir els fonaments de l'estudi molecular de la VWD d'un important número de mostres i a un cost molt inferior al que es pot oferir en l'actualitat amb les tècniques de seqüenciació tradicionals.

Barcelona, 2 de novembre de 2010

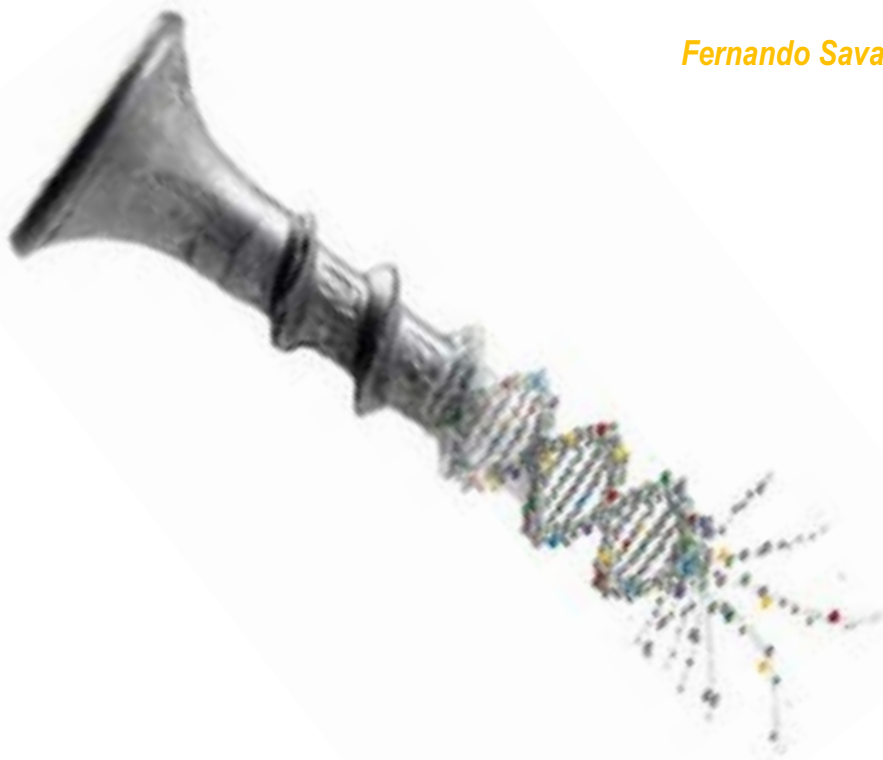


Dr. Francisco Vidal Pérez

Discussió

Es mejor saber después de haber pensado y discutido que aceptar los saberes que nadie discute para no tener que pensar.

Fernando Savater



Discussió

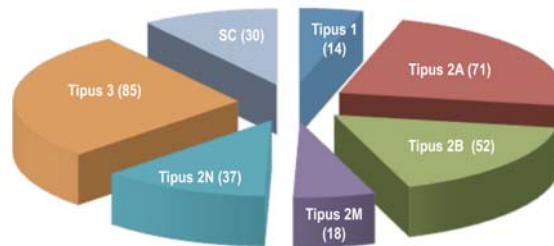


En el moment d'iniciar el present projecte, a mitjans de 2006, els protocols de diagnòstic molecular descrits pels principals laboratoris implicats en el diagnòstic molecular de la VWD i d'altres coagulopaties, descartaven l'ús de la seqüenciació nucleotídica com a tècnica de rutina per a la caracterització del defecte genètic en pacients afectes de VWD [Hashemi Soteh et al. 2007]. El VWF s'ha considerat un gen massa gran i complex per plantejar el seu anàlisi exhaustiu per seqüenciació de forma sistemàtica en un marge de temps raonable. Donada aquesta situació, gran part dels procediments de rutina per al diagnòstic es basaven, i en molts casos encara és així, en qualsevol de les nombroses tècniques de cribatge de mutacions existents, o en la seqüenciació de l'exó 28, que és on es localitzen la majoria de mutacions de tipus 2. La composició de la base de dades internacional (<http://www.shef.ac.uk/vwf>) en el moment d'iniciar el projecte és un clar reflex del que succeïa amb el diagnòstic molecular de la VWD (Figura 16). En aquell moment la base contenia un total de 307 entrades, on les mutacions de tipus 1 només representaven el 4,5% del total d'entrades quan, en realitat, suposen el 70% dels casos. Per altra banda, les mutacions de tipus 2 (15-20% dels casos) es trobaven sobrerrepresentades amb un 58% d'entrades. A més, el fet que més del 50% es localitzessin a l'exó 28 del gen, que representa només el 14% de la regió codificant, mostra l'existència d'una clara desviació metodològica que fa que les mutacions més estudiades siguin les més fàcils d'identificar. Aquesta desproporció es va equilibrar lleugerament quan, el 2007, tres publicacions provinents d'estudis

DISCUSSIÓ

multicèntrics del Regne Unit [Cumming et al. 2006], Europa [Goodeve et al. 2007] i Canadà [James et al. 2007] van contribuir amb 135 mutacions addicionals de tipus 1.

Figura 16: El contingut de la ISTH VWF Database el 2006 era de 307 entrades amb una distribució de 14 mutacions de tipus 1, 71 mutacions de tipus 2A, 52 mutacions de tipus 2B, 18 mutacions de tipus 2M, 37 mutacions de tipus 2N, 85 mutacions de tipus 3 i 30 mutacions sense classificar.



Pel que respecta a Espanya, segons el "Inventario de Laboratorios de Análisis Genético Molecular en España" de 2004 realitzat pel Ministerio de Sanidad y Consumo Instituto de Salud Carlos III, en aquells moments només existien dos laboratoris que desenvolupessin el diagnòstic molecular de la VWD: Hospital La Fe (València) i Hospital Materno-Infantil Teresa Herrera, Complejo Hospitalario Juan Canalejo (A Coruña). En aquests laboratoris, la tècnica utilitzada per a identificar les mutacions en el VWF eren la seqüenciació directa de l'E28 a La Coruña [Penas et al. 2004] i l'ús de les tècniques de criatge SSCP i CSGE a València [Casana et al. 2006]. Només 14 mutacions provinents de laboratoris espanyols havien estat incloses a la base de dades internacional. Es feia evident, aleshores, la necessitat d'aprofundir en l'estudi genètic de la VWD per a una millor caracterització de la població a nivell nacional. El diagnòstic molecular de la malaltia, que resulta essencial per a una bona classificació i per a l'aplicació d'un tractament adequat, era una mancança assistencial al nostre país. La caracterització del VWF en un gran nombre de pacients i familiars, a part de ser una eina necessària per establir la contribució de cada variació genètica a la clínica de la VWD, permetria realitzar estudis epidemiològics i estadístics de relació entre el tipus de mutació i aspectes clínics de la malaltia, però també oferiria la possibilitat d'aprofundir en l'estudi de mutacions concretes per obtenir informació sobre alguns dels mecanismes bàsics implicats a la VWD.

1. Dificultats diagnòstiques

1.1 Diagnòstic clínic

Degut a la dificultat que suposa realitzar un bon diagnòstic clínic de la VWD, resulta essencial un seguiment exhaustiu de la clínica hemorràgica i dels paràmetres de laboratori dels pacients. L'avaluació clínica de la VWD es basa principalment en l'acumulació d'un historial personal significatiu d'hemorràgies mucocutànies. En aquesta malaltia, els símptomes més habituals són l'aparició de blaus, epistaxis i hemorràgies perllongades després d'intervencions dentals, encara que els hematomes musculars i l'hemartrosi es poden manifestar en pacients amb VWD de tipus 3, on els nivells de FVIII també són gairebé nuls [Lillicrap 2008]. Degut a que molts dels símptomes hemorràgics de la VWD també succeeixen amb freqüència a la població normal, la MCMDM-1 VWD va elaborar un qüestionari per tal de valorar la clínica hemorràgica de manera objectiva que ha esdevingut una eina útil per a la identificació de pacients amb VWD de tipus 1 [Tosetto et al. 2006]. Pel fet que la única manifestació d'hemorràgies significatives en dones amb VWD pugui ser la menorragia, és particularment important la realització d'una avaluació detallada de l'historial menstrual de la pacient [Kouides 2008]. Aquests qüestionaris són utilitzats actualment a la Unitat d'Hemofília de l'Hospital de la Vall d'Hebron per a la valoració clínica dels pacients amb sospita de VWD de tipus 1 (veure Annexos 1 i 2).

Una altra dificultat en el diagnòstic d'aquests pacients és la necessitat de realitzar una sèrie d'estudis de laboratori que encareixen i perllonguen el temps per a la classificació de la malaltia. Les proves que s'utilitzen inclouen tests d'screening inicials, tests d'anàlisi del VWF (VWF:Ag, VWF:RCo, FVIII:C) i tests per determinar el subtipus de la malaltia (RIPA, VWF:FVIII B, VWF:CB, VWFpp, perfil de multímers del VWF) [Goodeve 2010]. Tot i que els assajos de VWF:Ag tenen força precisió i reproductibilitat, les proves de VWF:RCo són molt variables [Favaloro et al. 2001], el que pot portar a classificacions incorrectes o a diagnòstics erronis [Laffan et al. 2004]. La penetrància

DISCUSSIÓ

incompleta i l'expressió variable deguda a factors ambientals o epigenètics afegeixen més complexitat al diagnòstic d'aquesta malaltia donat que els resultats obtinguts han d'analitzar-se tenint en compte el grup sanguini [Gill et al. 1987] i en diferents ocasions per tal d'evitar la variabilitat temporal [Abildgaard et al. 1980], el que comporta un important volum de feina i de temps dedicat [Pruthi 2006].

Degut a aquestes dificultats, es feia necessari el disseny d'una tècnica ràpida i fiable per desenvolupar l'estudi genètic de la VWD, identificar la presència de mutacions al *VWF* i oferir un servei de diagnòstic molecular a aquests pacients.

1.2 Diagnòstic molecular

El nostre objectiu ha estat el de desenvolupar una eina de diagnòstic molecular simple i eficaç que pugui integrar-se a la rutina del laboratori donat que, aquest tipus d'anàlisi, ofereix una valuosa informació per a confirmar o descartar un diagnòstic clínic. Aquesta anàlisi resulta essencial en els casos en que el diagnòstic pot implicar un canvi en el tractament del pacient [Budde 2008] com serien: la diferenciació entre una HA moderada i una VWD de tipus 2N, important per a realitzar un consell genètic i un tractament adequat.; la necessitat de distingir entre els tipus 2A i 2B degut a la contraindicació de tractar amb DDAVP a pacients amb VWD de tipus 2B (veure punt 2.4.2 de la introducció); i la identificació de les mutacions a les famílies amb VWD de tipus 3, donat que els portadors en heterozigosi de les mutacions poden presentar nivells normals de factor i ser asimptomàtics [Pruthi 2006]. En aquestes famílies, la identificació de les mutacions és essencial a l'hora de realitzar estudis prenatals i oferir un consell genètic (veure apartat 2.1 de la discussió).

Algunes de les dificultats que se'ns plantejaven a l'hora de dissenyar un protocol per a la caracterització molecular del *VWF*, són degudes a la seva complexitat. En primer lloc, donat que es troba situat en un cromosoma autosòmic, l'estudi amb amplificació específica per PCR i seqüenciació directa requereix d'una anàlisi bioinformàtica molt

exhaustiva i sensible per tal d'identificar les mutacions en heterozigosi. En segon lloc, l'existència d'un pseudogèn parcial al cromosoma 22 d'aproximadament 30 kb amb una homologia superior al 96% als exons 23-34 del *VWF* [Mancuso et al. 1991] suposa un problema addicional a l'hora de dissenyar *primers* que reconguin la seqüència del gen de forma específica. Actualment s'han descrit diferents protocols per a l'amplificació selectiva del gen on és especialment important l'estudi acurat de les seqüències per tal de dissenyar els *primers* en els seus punts de divergència [Mancuso et al. 1989; Mancuso et al. 1991] i la temperatura d'*annealing* de la PCR [Kasatkar et al. 2010]. En tercer lloc, la seva grandària (52 exons al llarg de 178 kb) dificulta l'anàlisi completa del gen degut al nombre de reaccions necessàries per cobrir l'amplificació de tot el gen. Aquest fet fa que els costos de seqüenciació completa siguin elevats si no s'utilitza un protocol molt optimitzat, i que molts laboratoris hagin optat per seqüenciar diferencialment uns exons respecte els altres depenent de quina sigui la clínica del pacient. Per últim, el seu caràcter altament polimòrfic requereix d'una anàlisi molt acurada per a la identificació dels 102 SNPs descrits en regió codificant. Cal l'elaboració de plantilles on es contemplin tant els SNPs coneguts com les diferències puntuals existents al pseudogèn per tal de facilitar l'anàlisi (un total de 168 variacions a tenir en compte només en la regió codificant) i evitar l'elaboració de diagnòstics erronis. A més, no es pot descartar l'existència de mutacions en regions intròniques profundes o en altres gens que puguin influir en els nivells de *VWF* donat que els mecanismes d'expressió i processament d'aquest gen són molt complexos, el que explicaria el fet que, en una mateixa família, la simptomatologia pugui variar de forma substancial [Miller et al. 1979].

2. Tècniques aplicades al diagnòstic molecular de la VWD.

A l'hora de plantejar-nos quina era la millor estratègia per abordar l'estudi del *VWF*, vam avaluar les aproximacions utilitzades actualment en el diagnòstic molecular de la VWD. Com destacàvem al punt 4.2 de la introducció, les tècniques de diagnòstic

DISCUSSION

molecular aplicades a la VWD són diverses: tècniques indirectes [Goodeve et al. 2007] o de lligament genètic, tècniques d'*screening* de mutacions [Schneppenheim et al. 2007] i seqüenciació gènica directa [Gupta et al. 2008].

Prenent com a exemple els centres amb més mutacions descrites a la base de dades internacional, les estratègies de seqüenciació utilitzades per al diagnòstic de la VWD són diverses. Per una banda, a l'estudi europeu, van participar 14 centres de 9 països diferents. Només tres centres van desenvolupar l'anàlisi per seqüenciació directa. La resta van fer servir diferents mètodes indirectes per a la identificació de mutacions com ara CSGE, SSCP, DHPLC que requereixen una posterior seqüenciació de la regió d'interès [Goodeve et al. 2007]. A l'estudi canadenc participaven 13 centres i el seu mètode de seqüenciació es basava en l'amplificació i seqüenciació inicial de l'exó 1 i els exons del 18 al 52 i, en els casos en que no es va trobar mutació, seqüenciar del 2 al 17 [James et al. 2007]. Respecte a les entrades descrites per la xarxa francesa de diagnòstic, gran part no estan publicades i la resta pertanyen a un estudi de 1997 restringit a mutacions de tipus 2 on l'anàlisi es realitzava únicament a les regions d'interès [Meyer et al. 1997]. El quart grup amb més entrades a la base de dades és italià i la seva estratègia per identificar les mutacions és fer un *screening* inicial de les mutacions més freqüents per anàlisi amb enzims de restricció. En els pacients que no s'identifica cap mutació, es duu a terme una anàlisi per SSCP de tots els exons del VWF seguida de la seqüenciació directa d'aquells exons que tinguin una mobilitat alterada [Baronciani et al. 2000]. En definitiva, malgrat els centres van utilitzar diferents estratègies, en la majoria dels casos va ser necessària la seqüenciació final del VWF per tal de validar els resultats.

2.1 Diagnòstic prenatal

En les últimes dècades el diagnòstic prenatal s'ha aplicat a parelles amb un risc elevat de transmetre una malaltia genètica a la seva descendència i és una de les aplicacions més encoratjadores del diagnòstic genètic de la VWD. Aquest tipus de diagnòstic

resulta imprescindible dins el suport assistencial que ofereix la nostra unitat i s'aplica de forma rutinària en el consell genètic d'altres coagulopaties congènites. Un dels mètodes utilitzats per al diagnòstic molecular prenatal és la biòpsia de còrion, en la qual s'obté una mostra de vellositats coriòniques d'origen fetal [Brambati and Tului 2005]. Un segon mètode és l'amniocentesi o obtenció de líquid amniòtic. Per a la VWD, aquest tipus de diagnòstic és habitual en famílies que ja tenen un fill amb VWD de tipus 3, ja que sovint els pares no presenten cap clínica i no coneixen la seva condició de portadors fins que neix el primer fill afectat. En aquests casos, es tracta de caracteritzar els dos al·lells afectats i confirmar l'estat de portadors dels pares. Aleshores, a partir d'una mostra de líquid amniòtic, s'extreu el DNA del fetus i es procedeix a seqüenciar les regions afectades als seus pares per veure si és portador o no de les mutacions presents als seus progenitors. En el cas que les mutacions no hagin estat identificades en els pares o com a complement del diagnòstic, és comú l'ús d'anàlisis de lligament per identificar els al·lells portadors [Keeney et al. 2008].

3. Avantatges de la seqüenciació completa i directa.

Degut a la grandària del *VWF*, molts centres de diagnòstic han optat per estudiar diferencialment una regió o una altra depenent de quin sigui el diagnòstic clínic inicial del pacient. Actualment trobem guies per al diagnòstic molecular de la VWD [Keeney et al. 2008] que recomanen la seqüenciació de l'E28 en els casos de tipus 2A, 2B i 2M, tot i que hi ha mutacions de tipus 2A localitzades a altres regions del gen, i la seqüenciació dels exons 18 al 20 en el cas de tipus 2N quan, en tractar-se d'un tipus recessiu, s'espera que la mutació, si no està en homozigosi, es trobi acompanyada d'una altra mutació en qualsevol regió de l'altre al·lel [Mazurier et al. 2001]. Fins i tot per a la VWD de tipus 1 i 3, on el defecte molecular pot trobar-se a qualsevol regió del gen, es proposa la opció d'iniciar l'estudi seqüenciant els exons del 35 al 52 que és on s'han trobat la major part de mutacions d'aquests tipus (segons la ISTH VWF Database) però, en tots els casos, es recomana la seqüenciació completa de totes les regions

DISCUSSIÓ

essencials del *VWF* [Keeney et al. 2008]. L'anàlisi de tot el *VWF* és fonamental a l'hora de fer una bona caracterització entre genotip i fenotip ja que permet demostrar la contribució de cada mutació a la clínica del pacient. Amb aquest objectiu, s'han utilitzat un gran nombre de tècniques de diagnòstic indirecte per abordar l'anàlisi de les mutacions en el *VWF* [Kakela et al. 2006; Hashemi Soteh et al. 2007; Ahmad et al. 2009; Ota et al. 2009]. Tant el diagnòstic indirecte com la seqüenciació directa [James et al. 2007] han demostrat ser tècniques eficaces per a la detecció de mutacions en la *VWD*. D'altra banda, tant les tècniques d'*screening* de mutacions com les de diagnòstic indirecte tenen en comú, com a pas final, la lectura de la seqüència de nucleòtids i requereixen d'un esforç de manipulació considerable i personal molt qualificat. A més, degut a que el *VWF* és molt polimòrfic, les anàlisis indirectes esdevenen especialment feixugues pel fet que l'alt nombre de variacions identificades a diferents parts del gen fa que s'hagin d'acabar seqüenciant un gran nombre de fragments.

Amb l'objectiu d'estudiar en profunditat el *VWF*, d'identificar totes les variacions presents en pacients amb *VWD* i fer-ho amb un mètode ràpid i efectiu, vam considerar que la seqüenciació completa i directa del *VWF* era l'eina més adient per a la detecció de les variacions de seqüència, les mutacions i els SNPs. L'objectiu del nostre treball en els últims anys ha consistit a dissenyar i desenvolupar un procés ràpid i senzill que ens permeti identificar les mutacions al *VWF* en pacients amb *VWD* per seqüenciació completa del gen.

4. Avantatges del protocol dissenyat. Una bona tècnica per a un bon diagnòstic.

La idea inicial de plantejar la cerca del defecte genètic a la *VWD* per seqüenciació directa del *VWF* sorgeix de l'experiència prèvia del laboratori en el diagnòstic molecular d'altres coagulopaties com ara les hemofílies A [Vidal et al. 2001] i B [Vidal et al. 2000]

o els dèficits de FXI, FXIII, Les dificultats en el cas del *VWF* eren importants donada la seva mida i complexitat i la *VWD* requeria d'una metodologia de diagnòstic directe prou simplificada i robusta com per ser implementada en un laboratori com a mètode de rutina. La optimització del protocol de diagnòstic per al *VWF* [Corrales et al. 2009], li ha conferit una sèrie de característiques a remarcar en qualsevol tècnica d'anàlisi:

- **Senzillesa:** s'ha optimitzat el procediment utilitzant plaques *microtiter* congelades a -20°C amb els *primers* llestos per ser utilitzats per a amplificar els 52 exons i les regions intròniques flanquejants de dos pacients de forma simultània. Això ha estat possible gràcies a que alguns exons són amplificats de forma conjunta gràcies a la seva proximitat (E4-5, E23-24, E29-30, E39-40 i E46-47) i a l'amplificació per múltiplex dels exons 18 i 19.
- **Sensibilitat:** amb 100 ng de DNA en un volum final de 25 μl per reacció es realitzen un total de 47 PCRs per pacient que s'amplifiquen de forma simultània sota les mateixes condicions de termociclat i concentració de MgCl_2 i donen lloc a una gran quantitat de producte amb una alta especificitat. Amb només 2,5 μl del producte de PCR es seqüencien i s'analitzen les mostres per electroforesi capil·lar.
- **Fiabilitat:** l'anàlisi de les seqüències es realitza mitjançant l'ús d'un programa informàtic on s'ha dissenyat una plantilla específica amb la seqüència anotada del *VWF* i on s'han identificat tant els 102 cSNPs descrits (base de dades d'SNPs Build 132) com les diferències puntuals amb el pseudogèn. Això permet analitzar un total de 10.889 nucleòtids per pacient i identificar el defecte molecular de forma automàtica minimitzant les probabilitats d'error. A més, la recomprovació de les mutacions repetint el procediment d'amplificació i la seqüenciació amb els dos *primers* (*forward* i *reverse*) permet evitar errors i discriminar possibles artefactes.
- **Rapidesa:** utilitzant un seqüenciador de 4 capil·lars, el temps total emprat en la tècnica, des de l'arribada de la mostra de sang fins a la identificació de la mutació,

DISCUSSIÓ

és de 24 hores per pacient amb només 6 hores de manipulació per part del personal (Figura 17). Com el temps total d'electroforesi capil·lar amb el nostre seqüenciador és de 14 hores, l'ús d'un seqüenciador de 8 capil·lars pot reduir aquest temps a la meitat.

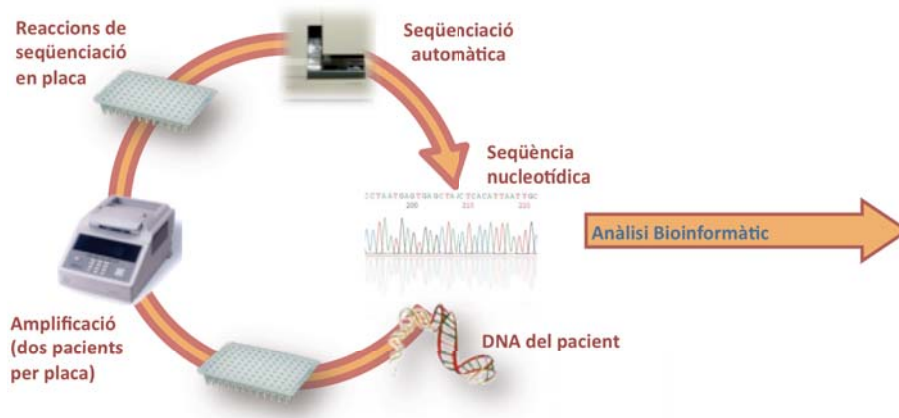


Figura 17: Esquema del procediment d'amplificació completa del VWF. Es vol destacar que el procés, des de l'arribada de la sang del pacient al laboratori fins a la identificació de la mutació, pot realitzar-se en 24 hores.

Aquestes característiques es tradueixen en l'abaratiment dels costos diagnòstics que afecten, tant al material fungible necessari, com al personal encarregat de dur-lo a terme i fa, d'aquest, un procediment efectiu també des del punt de vista econòmic.

L'aplicació d'innovacions tecnològiques de seqüenciació i genotipat desenvolupats al nostre laboratori per a la caracterització molecular del VWF permet un diagnòstic més precís de la VWD basat en la identificació de les mutacions responsables d'aquesta coagulopatia i progressar en la seva definició etiològica i epidemiològica des del punt de vista molecular. Això suposa un important progrés assistencial contribuint a la definició exacta de les mutacions subjacents i, per tant, aprofundir en la seva patogènia i en la generació de millors i noves aproximacions diagnòstiques.

5. La millor validació, els resultats. Estudi de 64 famílies.

L'aplicació de la tècnica desenvolupada s'ha utilitzat per a realitzar l'anàlisi molecular a 64 famílies, identificant-se les mutacions responsables en 40 pacients afectes de VWD i a 53 familiars. La major part de les mostres provenen de la unitat d'Hemofília de l'Hospital de la Vall d'Hebron, però també n'hi ha d'altres hospitals i centres de diagnòstic. Per a cada propòsit, es realitza la seqüenciació completa de tots els exons i regions intròniques flanquejants, i cada possible mutació es recomprova repetint la PCR de la regió afectada i seqüenciant amb els dos *primers* per evitar possibles artefactes de seqüència. En el cas dels familiars relacionats, s'amplifica la regió d'interès per comprovar la presència de la transmissió de la mutació. A més, es realitzen estudis de lligament per STRs [Vidal et al. 2005] a tots els pacients i familiars, el que ens permet establir els marcadors per a cada al·lel i crear arbres familiars, així com discriminar aquelles famílies en que la simptomatologia no es troba lligada al *VWF*. Les STRs ens ajuden a relacionar l'al·lel portador de la mutació amb la clínica hemorràgica dels diferents membres de la família, a estudiar la seva herència al llarg de les diferents generacions i, quan s'apliquen a un gran nombre de pacients, a determinar l'efecte fundador d'algunes mutacions observades repetidament en al·lells amb els mateixos marcadors.

A part de les mutacions potencialment causants de VWD, tot just comença a explorar-se l'efecte de les variants en la seqüència que poden modular el fenotip [Goodeve et al. 2007; Eikenboom et al. 2009]. En aquesta línia, donat que es realitza la seqüenciació completa del *VWF*, disposem, per a cada pacient i diferents familiars, de les dades genotípiques dels 102 cSNPs descrits al *VWF* (SNP database Build 132). Aquestes dades ens permetran investigar en el futur la possible participació d'aquests polimorfismes en la modulació de la gravetat i les manifestacions clíniques de la VWD.

DISCUSSIÓ

Amb el protocol per a la seqüenciació completa del *VWF* hem estat capaços d'identificar la mutació a tots els pacients amb VWD de tipus 2 i 3, on es van trobar un nombre de mutacions candidates que podien explicar el seu fenotip. En el cas dels pacients de tipus 1, en canvi, d'un total de 34 pacients estudiats, en 25 no es va poder identificar la mutació responsable. Davant aquesta situació es va decidir realitzar un seguiment clínic exhaustiu d'aquests pacients i en 10 casos, degut a que els pacients no complien els requisits de nivells de factor, clínica o herència establerts [Sadler and Rodeghiero 2005], es va descartar el diagnòstic de VWD. El fet que la seqüenciació directa del DNA sigui el millor mecanisme per al diagnòstic molecular [Keeney et al. 2008], ja que representa una evidència de l'existència o absència de mutacions, pot portar als centres a sol·licitar estudis genètics en pacients que no estan ben caracteritzats o són poc clars. Aquests casos posen de manifest la importància d'un diagnòstic clínic acurat que inclogui una valoració objectiva de la clínica hemorràgica, a través del qüestionari, i un estudi espaiat dels paràmetres de laboratori. En els 15 casos restants, la dificultat en la identificació del defecte molecular podria atribuir-se al fet que el nostre protocol de seqüenciació no és capaç d'identificar algunes mutacions que s'han descrit com a responsables per a dèficits quantitius de *VWF* com ara grans delecions [Schneppenheim et al. 2007], mutacions a la regió promotora [James et al. 2007] i mutacions en regions intròniques profundes. A més, mutacions en altres regions genòmiques no es veuen contemplades en aquest protocol. D'altra banda, cal remarcar que s'ha descrit que més del 50% dels casos diagnosticats com a VWD de tipus 1 no presenten una mutació identificable a les regions essencials del *VWF* i el fenotip no sempre es troba lligat al gen [Castaman et al. 1999; Eikenboom et al. 2006; James et al. 2007]. Aquest fet ja es contempla en l'actualització de criteris per a la classificació de la VWD de tipus 1 del 2006 [Sadler et al. 2006], que inclou el fet que la VWD no es troba restringida a mutacions en el *VWF*, el que explica que en molts pacients no s'hagi identificat la mutació responsable, i que el fenotip de la VWD pugui tenir altres causes genètiques. D'altra banda, per tal de poder assegurar que la VWD no es troba relacionada amb el *VWF* cal suplir les mancances del protocol dissenyat desenvolupant estudis per detectar grans delecions o duplicacions com ara la *Multiplex Ligation-*

dependent Probe Amplification (MLPA), ampliant la seqüenciació a la regió del promotor, o estudiant regions intròniques com comentarem, més endavant, en el capítol dedicat a les tecnologies de NGS.

6. Mutacions identificades.

Hi ha molts tipus diferents de mutacions responsables de la VWD. La majoria d'elles són comuns a d'altres tipus de malalties hereditàries, però n'hi ha que resulten de les característiques particulars del *VWF*. La revisió dels resultats obtinguts mostra que s'han detectat un total de 41 mutacions diferents (58 en total), 19 de les quals no s'havien descrit prèviament a la literatura. Hem identificat un total d'11 mutacions de tipus 1, 15 de tipus 2A, 2 de tipus 2M, 3 de tipus 2N, 26 de tipus 3 i una de tipus 2 sense classificar. Respecte al tipus de mutació, es van identificar un total de 44 substitucions incloent-hi 5 mutacions sense sentit i 6 mutacions que formen part d'una conversió gènica, 2 insercions, 11 PSSM i la primera indel descrita al *VWF*. De les 19 noves mutacions identificades, es pot destacar la presència d'un canvi sense sentit, dues insercions i una indel, així com 7 substitucions que es consideren PSSM per que, o bé són sinònimes o es troben localitzades en regió intrònica. Aquests resultats demostren la validesa d'aquest protocol com a mètode per al diagnòstic molecular de la VWD. L'alt grau d'optimització de la tècnica permet la seva aplicació a la rutina de qualsevol laboratori de diagnòstic molecular i permet oferir una identificació ràpida i eficaç de les mutacions localitzades al *VWF*.

La importància de desenvolupar la seqüenciació completa del gen queda demostrada en observar el patró de distribució de les mutacions identificades on es fa palès que les de tipus 1 i 3 es troben repartides al llarg de tot el *VWF* (veure pàgina 84). A més, per a la VWD de tipus 2, existeix la possibilitat de trobar altres mutacions que poden influir en la clínica del pacient. Un clar exemple de la importància de la seqüenciació completa del *VWF* en els tipus 2 és el cas de la família 32, diagnosticada de VWD de tipus 2M,

DISCUSSIÓ

on diferents membres presentaven característiques fenotípiques diferents. El cas índex tenia una clínica hemorràgica més greu que els altres membres, però tots ells presentaven una mutació nova a l'exó 28: 4225G>T, V1409F. No va ser fins a l'aplicació de la tècnica de seqüenciació completa del gen que vam veure que el propòsit, amb la clínica més greu, presentava una mutació a l'altre al·lel que podia explicar la seva gravetat. Es tracta de la substitució a l'exó 36: 6187C>T, P2063S, que ja havíem identificat en 2 pacients amb VWD de tipus 1 no relacionats. L'efecte d'aquesta mutació és controvertit donat que a la base de dades internacional es troba descrita com a mutació [James et al. 2007] i com a polimorfisme [Goodeve et al. 2007]. D'altra banda, aquesta substitució no es troba a l'actual versió de la base de dades d'SNPs (Build 132). En el nostre cas, només després de la seqüenciació completa del *VWF* i de comprovar que aquesta és la única variació existent respecte la resta de familiars, pot atribuir-se-li un potencial efecte deleteri que sigui el responsable de la clínica diferencial en aquests pacients.

Totes les mutacions de tipus 1 i 2 identificades són substitucions localitzades en exons o en regió intrònica, mentre que les mutacions de tipus 3, en canvi, presenten un ampli espectre de tipus diferents. A part de les substitucions, s'han identificat mutacions sense sentit, insercions, conversions gèniques i la primera indel descrita al *VWF*. L'efecte deleteri d'aquestes mutacions és obvi en la majoria dels casos donat que creen codons de parada prematurs produïts per un canvi en la pauta de lectura i un truncament de la proteïna.

El cas de la indel és especialment remarcable pel fet que és la primera que s'identifica al *VWF* (c.375-376delGTinsC) [Corrales et al. 2009]. Les indels representen un mecanisme relativament poc comú; només s'han descrit 1.511 mutacions d'aquest tipus en un total de 102.433 mutacions identificades a la *Human Gene Mutation Database*, representant l'1,47% del total de mutacions. Els mecanismes de les indels inclouen el desplaçament i desparellament de les cadenes deguts a repeticions directes de la seqüència i a la incorporació de bases promoguda per la formació d'estructures

secundàries que es veuen facilitades per la presència de seqüències palindròmiques, quasi-palindròmiques i elements simètrics [Chuzhanova et al. 2003]. En el nostre pacient, però, després d'analitzar exhaustivament les seqüències properes a la localització de la indel, no es va identificar cap element que ens pogués donar una explicació sobre el mecanisme molecular implicat a la mutació descrita. Sis mesos més tard de la publicació d'aquesta mutació es va descriure una nova indel a l'exó 8 del *VWF* (c.992_993delGCinsAA) identificada en heterozigosi en dues famílies aparentment no relacionades però amb un haplotip comú [Sutherland et al. 2009]. Fins al moment, aquestes són les dues úniques indels descrites al *VWF*.

La conversió gènica és un mecanisme força peculiar que succeeix entre el *VWF* i el *VWFP* i que ja s'havia descrit prèviament com un esdeveniment facilitat per la seva gran homologia i la presència de seqüències de tipus *chi* a l'intró 27 i l'exó 28 del *VWF* [Gupta et al. 2005]. En pràcticament tots els casos de conversió gènica entre loci causants de malaltia, el gen acceptor i el donant es troben al mateix cromosoma. El *VWF* és l'únic cas en que els gens implicats es troben en cromosomes diferents [Chen et al. 2007]. Hem descrit, en una família d'origen pakistanès, la presència d'una conversió gènica en homozigosi que implica un total de sis substitucions consecutives a l'exó 28 (c.4105T>A, c.4079T>C, c.4027A>G, c.3951C>T, c.3931C>T, c.3835G>A). Sorprenentment, aquesta mateixa mutació ja s'havia descrit prèviament en tres famílies independents [Gupta et al. 2008]. Tot i que aquest procés de mutagènesi és relativament poc comú, la prèvia identificació d'aquesta mutació en famílies aparentment no relacionades (no s'ha estudiat l'origen comú d'aquestes famílies donat que a l'article de Gupta *et al.* no mostren dades dels SNPs o marcadors d'STRs), reforça la idea que la conversió gènica, en el *VWF*, és un mecanisme relativament freqüent degut a que el gen es troba situat a l'extrem telomèric del cromosoma 12, i es coneix que aquestes regions són punts freqüents de recombinació [Chen et al. 2007].

La mutació c.3931C>T (p.Q1311X), també identificada al pacient amb la conversió gènica, s'ha identificat aïlladament, en homozigosi, en 3 pacients de tipus 3 d'origen

DISCUSSIÓ

romaní que no estaven relacionats. Donat que la variació coincideix amb un canvi puntual respecte el *VWFP*, no pot descartar-se que la mutació sigui causada per una conversió gènica, ja que la presència d'aquesta mutació també es podria deure a una recombinació entre ambdues seqüències [Gupta et al. 2008]. És destacable el fet que tots els progenitors d'aquests pacients, que presenten la mutació en heterozigosi, no mostrin cap mena d'afectació als nivells de laboratori ni cap símptoma de clínica hemorràgica malgrat que es tracta d'una mutació sense sentit. Al realitzar l'anàlisi de les STRs en els 4 pacients portadors d'aquesta mutació (3 d'origen romaní i 1 d'origen paquistanès), es va observar que tots ells compartien els mateixos marcadors cromosòmics, el que fa pensar en un origen comú. Aquesta mutació havia estat prèviament identificada en altres pacients espanyols d'origen romaní i es va postular la hipòtesi d'un origen comú previ a la dispersió d'aquest poble, provinent del nord-oest de l'Índia, que va crear un efecte fundador. El registre més antic d'aquesta dispersió data de l'any 1025 i, posteriorment, a mitjans del segle XV, el poble romaní es va assentar a Europa des de Dinamarca a Espanya [Casana et al. 2000].

La majoria de les 58 mutacions identificades es van trobar en només una família. Tot i això, com en el cas de la mutació p.Q1311X, algunes d'elles van ser descrites en diferents pacients. En total, s'han trobat 3 mutacions que apareixen en 4 famílies (p.Q1311X, p.R1374C i p.I1628T), 3 mutacions en 3 famílies (p.R1597W, p.P2063S i c.7730-1G>C) i 2 mutacions en 2 famílies (p.R816W, c.7082-2A>G). La demostració de la presència d'un haplotip compartit en aquests individus pot aportar indicis que, aquesta coincidència, resulti de l'herència d'un ancestre comú [Goodeve 2010]. Per aquest motiu, la identificació de les STRs, al nostre laboratori, es desenvolupa de forma rutinària a tots els pacients i familiars [Vidal et al. 2005]. Aquesta tècnica ens permet relacionar l'al·lel portador de la mutació amb la clínica hemorràgica dels diferents membres de la família, i estudiar la seva herència al llarg de les diferents generacions i, quan s'apliquen a un gran nombre de pacients, a determinar l'efecte fundador en algunes mutacions observades repetidament.

Taula 2: Resum de les mutacions del VWF trobades en diferents pacients no relacionats i la seva associació a marcadors d'STRs.

Regió gen	Canvi de nucleòtid	Canvi d'AA	IC	Tipus VWD	[VWF:Ag] [VWF:Rco] [FVIII:C]	ABO	Genotip de les STRs	Comentaris
E19	c.2664C>T	p.R816W	42	2N	116, 106, 6	A	21-6-12-18 21-6-12-19	Mutació en homozigosi al pacient 42. Mutació pot ser associada a un haplotip específic si es contempla inestabilitat de les STRs.
			62	2N	93, 104, 4	AB	21-6-12-17 (g) 22-7-15-14	
E28	c.3931C>T	p.Q1311X	41	3	0, 1, 2	AB	19-11-14-16 19-11-14-16	Pacient 41 presenta una conversió gènica amb 5 mutacions addicionals. Quatre pacients no relacionats amb els mateixos marcadors cromosòmics denota un origen comú. Mutació p.Q1311X es troba de forma recurrent en pacients romanis i es podria haver originat abans de la dispersió d'aquest poble des del nord-oest de l'Índia.
			69	3	7, 9, 1	O	19-11-14-16 19-11-14-16	
			233	3	6, 7, 4	-	19-11-14-16 19-11-14-16	
			241	3	6, 10, 13	-	19-11-14-16 19-11-14-16	
E28	c.4120C>T	p.R1374C	79	2A	28, 7, 24	A	21-7-15-14 19-6-12-17	Mutació no associada a un haplotip específic.
			141	2A	35, 11, 44	O	21-7-15-13 (g) 19-11-13-17	
			163	2A	31, 11, 43	-	19-7-15-17(g) 23-7-14-16	
			261	2A	23, -, 20	-	21-7-13-18 (g) 19-6-12-15	
E28	c.4789C>T	p.R1597W	49	2A	42, 8, 33	-	21-7-13-15 (g) 21-7-13-16	Mutació no associada a un haplotip específic.
			59	2A	15, 10, 30	O	21-7-15-18 19-7-14-16	
E28	c.4883T>C	p.I1628T	68	2A	27, 9, 15	-	21-11-16-16 (g) 21-7-15-14	Mutació associada a un haplotip específic al pacients 12, 15 i 58 si es considera la possibilitat d'una inestabilitat de les STRs en aquest últim pacient.
			12	2A	42, 17, 59	A	16-7-15-14 19-7-15-19	
			15	2A	46, 9, 49	A	16-7-15-14 20-7-14-17	
			58	2A	28, 8, 26	A	17-7-15-14 19-7-14-16	
E36	c.6187C>T	p.P2063S*	96	2A	27, 13, 23	-	19-7-14-16 (g) 21-11-17-14	Mutació del pacient 96 tindria un origen diferent.
			64	2M	9, 3, 12	A	19-11-15-16 21-7-14-16	
E36	c.6187C>T	p.P2063S*	94	1	21, 20, 23	A	19-11-14-15 (g) 21-7-14-15	Mutació trobada en heterozigosi composta amb la mutació p.V1409F en el pacient 64.
			181	1	54, 54, 50	O	24-12-15-15 (g) 23-6-12-15	
IVS41	c.7082-2A>G	-	25	3	3, 2, 1	O	22-11-14-17 19-7-14-15	Pacient 25 presenta la mutació p.S182S en el mateix cromosoma.
			52	3	5, 8, 3	A	20-11-14-16 19-7-14-16	
IVS45	c.7730-1G>C	-	2	3	7, 10, 7	A	21-7-14-16 21-7-14-16	Provable associació amb un haplotip específic, però el genotip no s'ha pogut establir en 2 pacients. Tots els pacients també presenten, en cis, l'SNP/mutació c.5170+10C>T.
			197	1	40, 30, 30	O	21-7-14-16 (g) 19-7-14-14	
			271	3	6, 6, 6	-	21-7-14-16 (g) 19-11-14-17	

Genotip de les STRs. En negreta s'indica el cromosoma associat a la mutació. AA: aminoàcid; IC: Cas índex; ABO: Grup sanguini; (g): haplotip no establert. *També descrites com a polimorfismes a la Isth database.

DISCUSSIÓ

A la Taula 2 es presenta un quadre detallat de les mutacions i la seva associació en haplotips identificats per STRs, així com la possibilitat d'un origen comú per efecte fundador. En un futur, l'estudi dels polimorfismes lligats a aquests marcadors, suposarà una informació addicional molt valuosa per correlacionar haplotips de forma més robusta.

Totes les mutacions identificades s'han enviat al registre internacional de mutacions de la VWD (ISTH-SSC VWFdb). D'aquesta manera hem esdevingut el 5è laboratori amb més aportacions a la VWFdb, el que resulta molt representatiu si tenim en compte que els 3 grups amb més registres corresponen a estudis multicèntrics d'Europa [Goodeve et al. 2007], Canadà [James et al. 2007] i França [Meyer et al. 1997].

7. Més enllà de la identificació de la mutació, desxifrant els seus efectes.

En el moment que s'identifica una variació en la seqüència del gen candidat per a una malaltia, és important establir si aquest canvi és neutre o pot ser el responsable dels desordres que presenta el pacient. L'estudi detallat de determinades mutacions permet aprofundir en el coneixement dels mecanismes implicats en el desenvolupament de la malaltia i oferir resultats d'interès per a la millor comprensió de la base genètica de la VWD. De les 41 mutacions diferents identificades, 19 no s'havien descrit prèviament. En aquests casos, en que no existeixen antecedents que corroborin l'efecte d'aquestes mutacions, a no ser que es tracti de mutacions amb un clar efecte deleteri (mutacions sense sentit o que afectin a la pauta de lectura), cal desenvolupar més estudis que ens permetin valorar la seva implicació en el fenotip dels pacients.

7.1 Estudis in silico

L'anàlisi en profunditat de totes les modificacions nucleotídiques identificades és un volum de feina considerable que no tots els laboratoris de diagnòstic molecular poden assumir. És per això que l'ús d'algoritmes que permetin una predicció fiable sobre l'impacte de les variacions nucleotídiques al processament de la proteïna esdevé una eina molt pràctica. Molts estudis sobre mutacions en el *VWF* han utilitzat els programes in silico per predir l'efecte de les variacions identificades, tant les localitzades en regió codificant com les PSSM. Alguns d'ells no desenvolupen altres tipus d'anàlisi i es basen únicament en els resultats de la predicció per a definir el possible efecte de les mutacions [Sutherland et al. 2009] però, a la majoria d'estudis, les anàlisis in silico s'utilitzen com a complement d'altres estudis in vitro o in vivo [James et al. 2007; Eikenboom et al. 2009; Berber et al. 2009]. Aquest fet demostra que la validació dels efectes de les mutacions basant-se, únicament, en aquest tipus de prediccions, no s'ha establert per a donar un diagnòstic definitiu. Les eines bioinformàtiques ens poden ajudar a predir l'efecte de la mutació i les seves conseqüències però, per tal de poder confirmar la relació entre mutació i malaltia, cal anar més enllà i realitzar estudis específics in vivo i/o in vitro per tal d'esclarir l'efecte real de la variació identificada. Tot i això, donades les millores que experimenten aquests programes d'una versió a una altra, no hi ha dubte que els estudis in silico seguiran avançant fins a fer-se lloc dins les tècniques de diagnòstic.

7.2 Estudis in vivo de les PSSM

Els estudis desenvolupats per conèixer l'efecte real d'aquestes mutacions es realitzen en RNA de plaquetes perquè, junt amb les cèl·lules endotelials, és el tipus cel·lular on majoritàriament s'expressa el *VWF* [Jaffe et al. 1974; Sporn et al. 1985]. D'altra banda, als leucòcits, s'ha demostrat l'existència de trànscrips d'mRNA de gens no expressats en aquestes cèl·lules [David et al. 2003]. L'anàlisi d'aquests trànscrips anomenats "ectòpics", s'ha utilitzat en la caracterització de mutacions en diferents desordres hereditaris [McVey et al. 1998; David et al. 2003] ja que facilita l'estudi de trànscrips

DISCUSSIÓ

amb un patró d'expressió restringit a un o pocs teixits [Roberts et al. 1993]. A més, l'anàlisi de plaquetes es veu limitat per un rendiment especialment reduït de l'mRNA, el que requereix una separació cel·lular extremadament acurada [Fink et al. 2003] i contrasta amb el fet que, en el cas dels leucòcits, l'extracció d'RNA es pot realitzar a partir d'un petit volum de sang, la quantitat d'mRNA obtingut és més alt, i existeixen kits d'extracció disponibles al mercat. Aquestes característiques fan que l'mRNA de leucòcits pugui ser un recurs molt útil per a l'estudi de mutacions en el *VWF*, però, degut al desconeixement del procés d'*splicing* del gen en aquestes cèl·lules, s'ha utilitzat de manera molt limitada en aquest tipus d'estudis [Plate et al. 2010].

Amb la tècnica desenvolupada per a la seqüenciació completa del *VWF* [Corrales et al. 2009] hem pogut identificar un total de 8 PSSM diferents, incloent-hi dues mutacions sinònimes, 6 de les quals no s'havien descrit prèviament. Per tal de revelar quins són els efectes reals d'aquestes mutacions sobre l'*splicing* del *VWF*, hem desenvolupat un protocol per a la seqüenciació completa de l'mRNA del *VWF* en leucòcits i plaquetes. Fins al moment, es desconeixia com era el processament del *VWF* en leucòcits, donat que tots els estudis d'RNA per a aquest gen s'han realitzat en plaquetes [Cumming et al. 2006; Goodeve et al. 2007] a excepció d'una carta a l'editor, publicada recentment [Plate et al. 2010]. En aquest article analitzen l'efecte de 3 mutacions utilitzant RNA dels dos tipus cel·lulars i observen que, en tots els casos, l'efecte és el mateix. La seqüenciació completa de l'RNA del *VWF* ens ha permès identificar la presència d'un *splicing* alternatiu en leucòcits d'individus control que produeix la pèrdua dels exons 14 i 15. La identificació d'aquest mecanisme diferencial és important a l'hora d'avaluar els resultats obtinguts de l'anàlisi de les mutacions en aquest tipus cel·lular. En el desenvolupament de l'estudi de les noves PSSM identificades en l'RNA dels dos tipus cel·lulars, vam observar que l'NMD és un mecanisme que es produeix de forma generalitzada en els al·lels portadors de PTCs en plaquetes. La degradació de l'RNA portador de la mutació impedeix l'amplificació estandarditzada de la regió afectada en aquestes cèl·lules. Als leucòcits, en canvi, degut a que no és el tipus cel·lular habitual d'expressió del *VWF*, l'efecte de l'NMD es veu dràsticament reduït, el que permet, en la

majoria de casos, l'amplificació amb normalitat de la regió portadora de la mutació. L'eficiència diferencial de l'NMD dependent de teixit és un mecanisme que ja s'havia descrit prèviament [Bateman et al. 2003] i que està relacionat amb el control de qualitat de la traducció [Isken and Maquat 2007], el que fa que, en teixits on no s'expressa aquesta proteïna, l'NMD tingui una incidència menor. Amb l'ús d'aquests trànscrips ectòpics, hem pogut analitzar l'efecte de les noves mutacions en l'*splicing* de l'RNA dels pacients. L'estudi en leucòcits va ser molt útil en la identificació de l'efecte de dues mutacions que, a nivell de plaquetes, produïen la degradació de l'RNA. Es va demostrar com la mutació c.533-2A>G promou l'*skipping* de l'exó 6, i la mutació c.7730-1G>C produeix l'activació d'un lloc críptic d'*splicing* situat en els dos primers nucleòtids de l'exó 46 provocant la seva deleció. En l'anàlisi de la mutació c.81553G>C, en canvi, pel fet que la mutació succeeix dins els 50 nucleòtids anteriors a la última unió exó-exó, la regió portadora de la mutació no es veu afectada per l'NMD [Maquat 2000] i permet observar com, tant en leucòcits com en plaquetes, es produeix l'*skipping* de l'exó 50. Aquesta observació corrobora la fidelitat del processament dels trànscrips ectòpics en leucòcits i la validesa d'aquest model cel·lular per a l'estudi de l'efecte de les mutacions a nivell d'RNA.

En el quadre resum que trobem a l'article 3 dels resultats (veure pàgina 103), es comparen les prediccions in silico de 4 programes bioinformàtics i l'efecte real observat en els dos tipus cel·lulars. És destacable, en alguns casos, la concreció a la que arriben la major part dels programes i com són capaços d'identificar tant la pèrdua de llocs d'*splicing* acceptors o donants, com l'activació de llocs crítics d'*splicing*. Els nostres resultats verifiquen tant la utilitat de l'RNA de leucòcits per a desenvolupar estudis sobre els efectes de les PSSM gràcies a la fidelitat dels trànscrips ectòpics que trobem en aquestes cèl·lules, com la validesa d'alguns programes de predicció in silico, que són capaços d'analitzar l'efecte potencial d'aquestes mutacions amb un grau de precisió gens menyspreable.

7.3 Estudis in vitro de les mutacions de canvi de sentit

Un pas endavant en l'estudi de l'efecte de les mutacions serà la realització d'estudis funcionals mitjançant l'expressió del *VWF* en cultius cel·lulars. La mutagènesi dirigida a partir d'un clon del cDNA del *VWF* permetrà introduir les mutacions que presenten especial interès per a l'estudi de la seva expressió in vitro i l'anàlisi funcional. Les característiques de les corresponents proteïnes recombinants mutades s'analitzaran en comparació amb la proteïna salvatge per veure el seu efecte en la funcionalitat de la proteïna. L'aplicació d'aquestes tècniques vindrà donada per l'interès a estudiar certes mutacions, ja sigui per poder aprofundir en el seu efecte, com per exemple en la variació c.6187C>T que s'ha descrit com a mutació i com a polimorfisme, o per a discernir les seves conseqüències quan no hagi estat possible el seu anàlisi per mitjà d'altres metodologies, com seria el cas de les mutacions c.546G>A o c.7082-2A>G que, al trobar-se en cis en el mateix al·lel, no s'ha pogut estudiar el seu efecte a nivell d'RNA. Els estudis funcionals ofereixen la possibilitat d'analitzar els efectes de les mutacions d'interès per poder comprendre la seva implicació a la clínica de la VWD.

8. NGS: el present de les tècniques de seqüenciació.

Les perspectives en el diagnòstic molecular de les malalties monogèniques ha canviat radicalment al llarg d'aquests últims anys amb la introducció de les noves plataformes de seqüenciació massiva, que representen la segona generació de les tècniques de seqüenciació del DNA [McPherson 2009]. La producció de grans quantitats de lectures a baix cost dona, a la NGS, un gran nombre de diferents aplicacions entre les que destaca la seva presentació com a alternativa o eina complementària a la seqüenciació tradicional basada en el mètode de Sanger [Metzker 2010]. Una de les aplicacions més encoratjadores és l'ús d'aquestes plataformes en el diagnòstic molecular de malalties hereditàries que s'estima que poden afectar al voltant d'uns 3 milions de persones a Espanya (www.orpha.net). Una de les majors preocupacions dels pacients i les seves

famílies és l'alt risc de transmetre la malaltia als seus descendents. Per aquest motiu, la identificació de mutacions responsables dels fenotips patològics és un objectiu primordial de la recerca genètica que serà facilitada per les aproximacions que permet la NGS per a l'estudi de certes regions del genoma. Per tal d'aprofitar l'aparició d'aquesta nova tecnologia en el diagnòstic de la VWD, hem iniciat el desenvolupament de procediments aplicables a qualsevol de les plataformes de NGS disponibles actualment que facilitin la caracterització d'una gran part de la població afectada de forma ràpida i econòmica. La validació d'aquesta tècnica s'està duent a terme en un analitzador genètic d'Illumina i s'han provat diferents estratègies per abordar la seqüenciació del *VWF*. Per una banda, vam voler adaptar el protocol desenvolupat preparant *pools* normalitzats de PCRs curtes. Aquests *pools* serien posteriorment fragmentats mitjançant una incubació amb calor, segons una tècnica descrita recentment [Rogaev et al. 2009] per tal que, els fragments resultants, s'adaptessin a les necessitats de la plataforma. D'altra banda, vam dissenyar un nou protocol per a l'amplificació del *VWF* utilitzant LR-PCRs. Aquests tipus de fragments s'adapten a un millor compliment dels criteris per a l'ús de la tecnologia massiva d'Illumina i la fragmentació del DNA pot fer-se d'acord amb el protocol estàndard utilitzant un nebulitzador. A més, aquests fragments podrien adequar-se millor a qualsevol de les noves plataformes disponibles al mercat. D'altra banda, l'anàlisi dels resultats va demostrar una millor cobertura del gen amb els *pools* de PCRs curtes i, malgrat que totes les mostres són adients per a la multiplexació, les LR-PCRs impliquen majors dificultats tècniques per a la seva realització i aporten una informació addicional (seqüències intròniques) que encara és difícil de valorar, amb les eines disponibles, des del punt de vista de la fisiopatologia de la malaltia.

Les noves tecnologies de seqüenciació massiva resulten realment rentables des del punt de vista econòmic quan s'utilitza tota la capacitat del seqüenciador a cada carrera, és a dir, quan es seqüencia el màxim nombre de mostres de forma simultània. Un dels avantatges d'aquesta tecnologia és la capacitat de multiplexar un gran nombre de mostres mitjançant l'ús de seqüències curtes que actuen com a etiqueta i que són

DISCUSSIÓ

afegides durant la construcció de les llibreries. Aquesta multiplexació permet analitzar un gran nombre de mostres simultànies (>96) a cada *flow cell*. En el moment de finalitzar aquesta memòria, ens trobem pendents dels resultats de la multiplexació i seqüenciació de dos grups de 25 pacients de VWD, el que permetrà plantejar el diagnòstic molecular de la VWD per seqüenciació massiva com una realitat diagnòstica en els pròxims mesos. Esperem que l'adaptació del nostre procediment [Corrales et al. 2009] a aquestes plataformes permetrà assolir un alt rendiment en la caracterització molecular de familiars i pacients amb VWD i establirà les bases per a poder realitzar estudis moleculars de la població a més gran escala.

Una de les eines que pot facilitar l'ús d'aquestes plataformes és l'aplicació de la tecnologia de microfluids per a la realització de les PCRs curtes. Un exemple són els arrays de Fluidigm® que permeten, en una sola placa, realitzar 48 PCRs de 48 pacients de forma simultània. Gràcies a un circuit integrat de fluids, es realitza la combinació entre mostres i kits de *primers* en un total de 2.304 PCRs, en un volum de reacció de només 9 nanolitres. El resultat de les amplificacions de cada pacient es recull en un tub llest per a ser analitzat en una plataforma de NGS. La optimització d'aquesta metodologia permet minimitzar els costos de reactius i el temps de manipulació donat que cada un d'aquests arrays equival a un total de 24 plaques de 96 pous.

9. Integració dels resultats en un registre on-line. VWFdb@Hemobase.

Les bases de dades de mutacions de gens humans estan assolint una importància creixent a totes les àrees de salut. Experts en l'estudi de determinats gens s'ocupen de la recollida de les mutacions publicades i no publicades en bases de dades de mutacions específiques per a un locus (LSMD) [Claustres et al. 2002]. Amb l'aplicació

de la tècnica desenvolupada per a la seqüenciació completa del VWF [Corrales et al. 2009] hem pogut identificar un gran nombre de defectes moleculars i, amb l'objectiu de crear una eina d'accés immediat a les mutacions noves o prèviament descrites identificades al nostre laboratori, hem creat una secció específica per a la VWD dins d'Hemobase, registre de mutacions responsables d'hemofília A i B. Hemobase (www.hemobase.com) és el primer registre de mutacions caracteritzades a partir de pacients hemofílics de la població espanyola. Amb 466 entrades, Hemobase és un registre dinàmic d'actualització contínua i la quantitat i rellevància dels seus continguts la fan una de les bases de dades de referència en el diagnòstic de l'hemofília. L'NCBI l'ha afegit a la llista d'enllaços d'interès relacionats amb el FVIII i el FIX. Ara, Hemobase ha ampliat el seu contingut amb la inclusió d'un registre de mutacions per a la VWD (<http://vwf.hemobase.com>). La VWFdb@Hemobase, creada al març de 2009 i d'accés públic, conté dades genotípiques i fenotípiques de les variacions identificades en el VWF com a possible causa de la VWD [Corrales et al. 2010]. El seu contingut i estructura segueixen diverses de les recomanacions de la *Human Genome Variation Society* per al disseny i seguiment de les LSMD [Claustres et al. 2002; Cotton et al. 2008]: cobreix diferents aspectes de les variants genètiques, proporciona una avaluació de qualitat per a cada entrada i conté informació sobre la malaltia i el fenotip clínic resultant (Figura 18).



Figura 18: Pàgina principal, pàgina d'informació sobre la clínica de la VWD i la pàgina amb les característiques bioquímiques del VWF a www.vwf.hemobase.com.

DISCUSSIÓ

Per tal de conèixer millor i poder aprofundir en la biologia molecular de la VWD, VWFdb@Hemobase inclou diferents enllaços al gen, a la proteïna i als SNPs coneguts, així com accessos directes a pàgines amb informació relacionada. A part de la informació general, també hi trobem el registre de mutacions, que pot consultar-se a través de quatre pàgines web relacionades que permeten ampliar la informació per a cada pacient o mutació. La informació que conté el registre correlaciona les dades clíniques dels pacients, on es mostren els valors dels paràmetres clínics i de laboratori rellevants; les dades moleculars, on s'ha inclòs tota la informació relativa a les mutacions de manera individualitzada; i informació de les mutacions descrites fins al moment gràcies a una còpia actualitzada de la ISTH SSC VWF Database [Ginsburg and Sadler 1993; Sadler and Ginsburg 1993] que permet conèixer les vegades que s'hi descriu aquella mateixa mutació, i accedir ràpidament a les publicacions on s'han identificat (Figura 19).



Figura 19: Diferents pàgines web del registre de mutacions: la pàgina de cerca avançada, la de dades clíniques, la de dades moleculars i la de la base de dades internacional. Gràcies a que totes elles es troben relacionades, es pot ampliar qualsevol informació accedint de l'una a l'altra.

Totes les mutacions que conté la VWFdb@Hemobase també han estat, i seran enviades en el futur, a la base de dades internacional. De fet, només s'inclouen 18 mutacions provinents de laboratoris espanyols abans de la nostra participació amb 41 mutacions diferents (58 en total), i el nostre laboratori ha esdevingut un important proveïdor de mutacions ja que ha aportat més del 10% del total de registres. La ISTH

SSC VWF Database, conté actualment un total de 526 mutacions, el que contrasta amb les 307 entrades que tenia el 2006. Aquesta base ofereix un ampli repertori de mutacions recollides a partir de les contribucions fetes per investigadors d'arreu del món. L'objectiu del registre d'Hemobase no és el de competir amb la base de dades internacional sinó el d'oferir una gran quantitat de dades suplementàries que inclouen estudis de laboratori, simptomatologia basada en el sistema del *bleeding score* del MCMDM-1 [Tosetto et al. 2006; Goodeve et al. 2007] per a una valoració objectiva de la clínica hemorràgica, anàlisis de les STRs [Vidal et al. 2005] i la representació dels arbres familiars que donen informació sobre la cosegregació de la malaltia amb la mutació. Tot i que actualment hi ha 40 casos índex, la base de dades també inclou dades moleculars de 53 familiars. La integració de les anàlisis de les mutacions junt amb les dades fenotípiques i familiars en una població ben definida és útil per a una millor comprensió dels mecanismes implicats en la fisiopatologia de la VWD i aporta una imatge dinàmica de l'epidemiologia molecular de la VWD a la nostra població.

Actualment, la VWFdb@Hemobase només conté dades generades al nostre laboratori, tot i que la nostra intenció és la de continuar el seu desenvolupament com a LSMD per al VWF en una iniciativa, actualment en marxa, promoguda per la Societat Espanyola de Trombosi i Hemostàsia (SETH) amb l'objectiu d'establir un registre nacional per a la VWD a Espanya. Aquest estudi implicarà diferents hospitals espanyols que participaran en la recollida de dades, diagnòstic i selecció dels pacients. El següent pas d'aquest projecte es pretén que sigui la realització de l'estudi genètic de tots aquests pacients. En aquest punt, serà de vital importància l'aplicació de les noves estratègies dissenyades per plataformes de NGS per a l'estudi complet del VWF. D'aquesta manera, VWFdb@Hemobase podria ser un dels punts de recollida de tota la informació generada amb aquests estudis, el que permetria la caracterització de la població espanyola afectada de VWD. El fet que VWFdb@Hemobase permeti consultar correlacions genotip-fenotip de manera estructurada i accessible fa que es tracti d'una valuosa eina per a l'estudi epidemiològic de la VWD a la nostra població.

10. Futur en el diagnòstic molecular de la VWD

Un dels objectius de la Unitat de Diagnòstic i Teràpia Molecular del Banc de Sang i Teixits és seguir donant el servei de diagnòstic genètic per a la VWD i que s'estableixin els procediments per a la seqüenciació completa del *VWF* segons la normativa de qualitat ISO 9001. Diferents grups ja s'han interessat per la tècnica desenvolupada i han rebut formació en l'aplicació d'aquest protocol per tal que pugui ser utilitzat com a mètode de rutina als seus laboratoris. Esperem que aquesta tècnica ajudi a millorar la tasca assistencial de diferents hospitals per tal de poder oferir un millor diagnòstic als pacients amb VWD.

Al nostre grup, se seguiran els estudis per suplir les mancances del mètode desenvolupat. Per una banda, s'ampliarà la seqüenciació per incloure la regió del promotor, donat que ja s'han descrit mutacions en aquesta regió que poden ser responsables de la VWD [Goodeve et al. 2007; James et al. 2007]. I per l'altra, per tal de detectar grans insercions o delecions, s'iniciarà l'aplicació de mètodes basats en l'anàlisi de la dosi gènica com és l'anàlisi per MLPA (veure apartat 5 de la discussió) que permeten la detecció de grans reordenaments genòmics [Gille et al. 2002].

Per aprofundir en l'estudi de les mutacions de nova descripció, una aplicació de les anàlisis *in silico* és l'ús de la modelització de l'estructura de les proteïnes mutants. La caracterització funcional de la seqüència de les proteïnes per tal de predir l'impacte de les mutacions [Eswar et al. 2007; Prokop et al. 2008] premet l'anàlisi de les seves potencials conseqüències utilitzant programes de visualització molecular i d'animació d'estructures tridimensionals com ara el Pymol [Seeliger and de Groot 2010]. Aquestes eines permeten aprofundir en l'estudi de l'efecte de les mutacions a nivell estructural i poden resultar molt útils per a una millor comprensió dels mecanismes implicats. Respecte als estudis funcionals, l'aparició de la tecnologia de reprogramació induïda pot proporcionar models cel·lulars que tinguin en compte tota la complexitat genètica

dels pacients. L'estudi amb línies d'iPSC generades a partir de cèl·lules de pacients s'ha utilitzat recentment amb èxit com a model de diferents malalties com ara l'esclerosi lateral amiotròfica [Dimos et al. 2008], l'atròfia muscular espinal [Ebert et al. 2009] i l'anèmia de Fanconi [Raya et al. 2009]. Aquests resultats mostren que les iPSC poden generar-se a partir de cèl·lules de pacients amb malalties genètiques que poden ser diferenciades al tipus cel·lular d'interès contenint, no només la mutació responsable de la malaltia, sinó també la complexitat genòmica del pacient en models humans genuïns. S'han desenvolupat protocols optimitzats utilitzant queratinòcits [Aasen et al. 2008] o fibroblasts dèrmics [Raya et al. 2009] per aconseguir generacions consistents d'iPSC a partir de biòpsies de pell de pacients [Raya et al. 2010]. Aquestes línies cel·lulars, convertides en cèl·lules pluripotents per transducció retroviral, es poden diferenciar a cèl·lules endotelials que poden utilitzar-se com a models de VWD. Establir un model in vitro d'alta qualitat en la VWD pot constituir una eina molt valuosa per dur a terme estudis funcionals més acurats relacionats amb la producció, processament, estructura i vida mitjana del VWF. Aquests models tenen un enorme potencial per a la investigació de la patogènia de la malaltia i, fins i tot, permeten l'anàlisi de fàrmacs in vitro.

Una altra àrea en la que cal seguir treballant és en l'estudi dels factors genètics responsables de l'àmplia variació entre individus dels nivells observats en plasma del VWF. El gen de l'ABO localitzat al cromosoma 9q34 s'ha relacionat clarament amb els nivells plasmàtics del VWF i explica al voltant del 30-40% de la variabilitat genètica. D'altra banda, la major part de les causes de component genètic segueixen sense esclarir-se. El projecte GAIT (*Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia*) va realitzar la identificació de gens implicats en la variació dels nivells normals de VWF en 21 famílies amb l'ús de tècniques de lligament *Genome-wide*. Després de refinar l'anàlisi de lligament, condicionat pel genotip de l'ABO, van identificar 3 loci addicionals als cromosomes 5, 6 i 22 que suggereixen la presència d'altres gens relacionats amb els nivells de VWF [Souto et al. 2003]. També s'han realitzat estudis en ratolins on s'han identificat 4 gens que participen en la regulació dels nivells plasmàtics de VWF [Lemmerhirt et al. 2007; Johnsen et al. 2009; Shavit et al. 2009]. La combinació dels

DISCUSSIÓ

efectes de 3 d'aquests gens explica al voltant del 45% de la variació genètica als nivells de VWF en el plasma dels ratolins. La gran homologia filogenètica d'aquests gens respecte 3 segments dels cromosomes humans 1, 5 i 6, alguns dels quals ja s'havien identificat anteriorment en el projecte GAIT, suggereix la presència d'ortòlegs que poden codificar per a gens modificadors del VWF en humans [Lemmerhirt et al. 2007]. Aquest mecanisme podria explicar un percentatge significatiu dels casos de VWD en humans en els quals no s'ha identificat cap mutació a la regió codificant del VWF.

Encara hi ha molts camps per explorar però queda clar que el futur del diagnòstic genètic passa per l'aplicació de les eines que ens ofereixen les noves plataformes de seqüenciació massiva.

Conclusions

Knowing is better than wondering, waking is better than sleeping and even the biggest failure, even the worst, beats the hell out of never trying.

Grey's Anatomy



Conclusions



- S'ha dissenyat una tècnica de seqüenciació directa que permet l'anàlisi de tots els exons i les regions intròniques flanquejants del *VWF* de forma fiable i eficaç. La tècnica s'ha optimitzat adaptant-la a format microplaca i ha esdevingut una eina senzilla i ràpida per a la seva implementació a la rutina del laboratori.
- S'han recollit un total de 160 mostres provinents de 90 famílies, de les quals se n'han caracteritzat 64 (un total de 117 individus repartits en 64 casos índex i 53 familiars). Amb l'aplicació del protocol desenvolupat s'han identificat un total de 58 mutacions (41 de diferents) distribuïdes al llarg de tot el *VWF* i 19 de les quals no s'havien descrit prèviament. Per tipus, s'han identificat 44 substitucions incloent-hi 5 mutacions sense sentit i 6 mutacions que formen part d'una conversió gènica, 2 insercions, 11 PSSM i una indel.
- S'han recopilat les dades clíniques i resultats de laboratori essencials per a la classificació en subtipus de la *VWD* de tots els pacients implicats en l'estudi. S'han identificat els defectes moleculars detallats en el punt anterior i, en la majoria de casos, amb les anàlisis de lligament, s'ha pogut identificar l'al·lel portador de la mutació i seguir-lo al llarg de l'arbre genealògic.

CONCLUSIONS

- S'ha creat una base de dades electrònica on es recullen totes les mutacions identificades al nostre laboratori després de la seqüenciació completa del *VWF* i on s'inclou la informació obtinguda a partir de l'estudi clínic i molecular de les famílies amb VWD. Part d'aquesta informació s'ha publicat de manera anonimitzada en un registre de mutacions disponible a Internet (www.vwf.hemobase.com) amb l'objectiu de fer accessible tota aquesta informació a pacients, clínics i investigadors interessats en aquesta malaltia.
- S'han realitzat anàlisis *in silico* de totes les mutacions noves identificades amb la tècnica de seqüenciació completa del *VWF*. S'han utilitzat diferents programes d'anàlisi, depenent de la naturalesa de la mutació, per fer prediccions sobre l'efecte de les substitucions de canvi de sentit i l'efecte de les PSSM, per veure el seu efecte sobre l'*splicing*.
- S'ha desenvolupat un procediment per a l'estudi de totes les regions de l'mRNA del *VWF* per RT-PCR que permet analitzar l'efecte en l'*splicing* de qualsevol mutació identificada al *VWF*. Aquesta tècnica s'ha aplicat en l'estudi concret de 7 PSSM i s'ha analitzat l'mRNA de leucòcits i plaquetes dels pacients portadors d'aquestes mutacions revelant els efectes de la majoria d'elles. A més, s'ha provat que l'ús de l'mRNA de leucòcits és una eina complementària de gran interès per al desenvolupament d'aquest tipus d'estudis i s'ha demostrat que l'NMD és un mecanisme que es produeix de forma generalitzada en els tràncrits del *VWF* portadors de PTCs en plaquetes.
- S'ha aplicat la NGS al *VWF* mitjançant l'adaptació del procediment prèviament desenvolupat i el disseny d'un nou protocol d'amplificació del gen per LR-PCR. Un cop validades les diferents aproximacions, s'han realitzat proves per avaluar la capacitat d'aquestes plataformes per seqüenciar un gran nombre de pacients i familiars simultàniament.

Referències

Don't keep forever on the public road,
going only where others have gone.

Alexander Graham Bell



Referències



A

Aasen, T., A. Raya, et al. (2008). "Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes." *Nat Biotechnol* 26(11): 1276-84.

Abildgaard, C. F., Z. Suzuki, et al. (1980). "Serial studies in von Willebrand's disease: variability versus "variants"." *Blood* 56(4): 712-6.

Ahmad, F., M. Kannan, et al. (2009). "Impact of Thrombogenic Mutations on Clinical Phenotypes of von Willebrand Disease." *Clin Appl Thromb Hemost*.

Alexander B, Goldstein B. (1953). *J Clin Invest* 32: 551.

B

Bachmann, F. (1980). "Diagnostic approach to mild bleeding disorders." *Semin Hematol* 17(4): 292-305.

Ball, E. V., P. D. Stenson, et al. (2005). "Microdeletions and microinsertions causing human genetic disease: common mechanisms of mutagenesis and the role of local DNA sequence complexity." *Hum Mutat* 26(3): 205-13.

Baronciani, L., G. Cozzi, et al. (2000). "Molecular characterization of a multiethnic group of 21 patients with type 3 von Willebrand disease." *Thromb Haemost* 84(4): 536-40.

Baronciani, L., G. Cozzi, et al. (2003). "Molecular defects in type 3 von Willebrand disease: updated results from 40 multiethnic patients." *Blood Cells Mol Dis* 30(3): 264-70.

REFERÈNCIES

- Bateman, J. F., S. Freddi, et al. (2003). "Tissue-specific RNA surveillance? Nonsense-mediated mRNA decay causes collagen X haploinsufficiency in Schmid metaphyseal chondrodysplasia cartilage." *Hum Mol Genet* 12(3): 217-25.
- Battle, J. (2010). Estudio epidemiológico de la enfermedad de von Willebrand en España. Congreso Nacional de la SETH.
- Bell, J. (2007) "Practice guidelines for the Interpretation and Reporting of Unclassified Variants (UVs) in Clinical Molecular Genetics." Volume, DOI:
- Bello, I. F., V. J. Yuste, et al. (2007). "Fanhdi, efficacy and safety in von Willebrand's disease: prospective international study results." *Haemophilia* 13 Suppl 5: 25-32.
- Bentley, D. R. (2006). "Whole-genome re-sequencing." *Curr Opin Genet Dev* 16(6): 545-52.
- Berber, E., P. D. James, et al. (2009). "An assessment of the pathogenic significance of the R924Q von Willebrand factor substitution." *J Thromb Haemost* 7(10): 1672-9.
- Berntorp, E. (1999). "von Willebrand disease: an update in the Aland islands." *Haemophilia* 5(Supplement 2): 1-6.
- Berntorp, E. (2009). "Haemate P/Humate-P: a systematic review." *Thromb Res* 124 Suppl 1: S11-4.
- Blombäck (1999). "Scientific visits to the Aland islands." *Haemophilia* 5(Suppl. 2): 12-18.
- Blomback, M., P. Eneroth, et al. (1992). "On laboratory problems in diagnosing mild von Willebrand's disease." *Am J Hematol* 40(2): 117-20.
- Bloom, A. L. (1980). "The von Willebrand syndrome." *Semin Hematol* 17(4): 215-27.
- Bloom, A. L. (1991). "von Willebrand factor: clinical features of inherited and acquired disorders." *Mayo Clin Proc* 66(7): 743-51.
- Brambati, B. and L. Tului (2005). "Chorionic villus sampling and amniocentesis." *Curr Opin Obstet Gynecol* 17(2): 197-201.
- Brunak, S., J. Engelbrecht, et al. (1991). "Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence." *J Mol Biol* 220(1): 49-65.
- Budde, U. (2008). "Diagnosis of von Willebrand disease subtypes: implications for treatment." *Haemophilia* 14 Suppl 5: 27-38.
- Budde, U., A. Pieconka, et al. (2006). "Laboratory testing for von Willebrand disease: contribution of multimer analysis to diagnosis and classification." *Semin Thromb Hemost* 32(5): 514-21.
- Byers, P. H. (2002). "Killing the messenger: new insights into nonsense-mediated mRNA decay." *J Clin Invest* 109(1): 3-6.

C

- Casals, T., J. Gimenez, et al. (1996). "Prenatal diagnosis of cystic fibrosis in a highly heterogeneous population." *Prenat Diagn* 16(3): 215-22.
- Casana, P., N. Cabrera, et al. (2006). "Von Willebrand's disease: a novel mutation, P1824H and the incidence of R1205H defect among families with dominant quantitative von Willebrand factor deficiency." *Haematologica* 91(8): 1130-3.
- Casana, P., F. Martinez, et al. (2000). "Q1311X: a novel nonsense mutation of putative ancient origin in the von Willebrand factor gene." *Br J Haematol* 111(2): 552-5.
- Castaman, G., J. C. Eikenboom, et al. (1999). "Inconsistency of association between type 1 von Willebrand disease phenotype and genotype in families identified in an epidemiological investigation." *Thromb Haemost* 82(3): 1065-70.
- Castaman, G., A. B. Federici, et al. (2003). "Von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment." *Haematologica* 88(1): 94-108.
- Castaman, G., S. H. Giacomelli, et al. (2010). "Homozygous type 2 N R854W von Willebrand factor is poorly secreted and causes a severe von Willebrand disease phenotype." *J Thromb Haemost*.
- Castaman, G., A. Toso, et al. (2009). "Reduced von Willebrand factor survival in von Willebrand disease: pathophysiologic and clinical relevance." *J Thromb Haemost* 7 Suppl 1: 71-4.
- Cesarman-Maus, G. and K. A. Hajjar (2005). "Molecular mechanisms of fibrinolysis." *Br J Haematol* 129(3): 307-21.
- Claustres, M., O. Horaitis, et al. (2002). "Time for a unified system of mutation description and reporting: a review of locus-specific mutation databases." *Genome Res* 12(5): 680-8.
- Corrales, I., L. Ramirez, et al. (2009). "Rapid molecular diagnosis of von Willebrand disease by direct sequencing. Detection of 12 novel putative mutations in VWF gene." *Thromb Haemost* 101(3): 570-6.
- Corrales, I., L. Ramirez, et al. (2010). "Integration of molecular and clinical data of 40 unrelated VWD families in a Spanish locus-specific mutation database. First release including 58 mutations." *Haematologica* Nov;95(11): 1982-4.

REFERÈNCIES

- Costa, J. M., P. Ernault, et al. (2000). "Fast and efficient mutation detection method using multiplex PCR and cycle sequencing--application to haemophilia B." *Thromb Haemost* 83(2): 244-7.
- Cotton, R. G., A. D. Auerbach, et al. (2008). "Recommendations for locus-specific databases and their curation." *Hum Mutat* 29(1): 2-5.
- Cumming, A., P. Grundy, et al. (2006). "An investigation of the von Willebrand factor genotype in UK patients diagnosed to have type 1 von Willebrand disease." *Thromb Haemost* 96(5): 630-41.
- Chen, J. M., D. N. Cooper, et al. (2007). "Gene conversion: mechanisms, evolution and human disease." *Nat Rev Genet* 8(10): 762-75.
- Chuzhanova, N. A., E. J. Anassis, et al. (2003). "Meta-analysis of indels causing human genetic disease: mechanisms of mutagenesis and the role of local DNA sequence complexity." *Hum Mutat* 21(1): 28-44.

D

- David, D., I. M. Santos, et al. (2003). "Analysis of the consequences of premature termination codons within factor VIII coding sequences." *J Thromb Haemost* 1(1): 139-46.
- Dehainault, C., D. Michaux, et al. (2007). "A deep intronic mutation in the RB1 gene leads to intronic sequence exonisation." *Eur J Hum Genet* 15(4): 473-7.
- Denis, C. V., K. Kwack, et al. (2001). "Interleukin 11 significantly increases plasma von Willebrand factor and factor VIII in wild type and von Willebrand disease mouse models." *Blood* 97(2): 465-72.
- Desmet, F. O., D. Hamroun, et al. (2009). "Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals." *Nucleic Acids Res* 37(9): e67.
- Dimos, J. T., K. T. Rodolfa, et al. (2008). "Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons." *Science* 321(5893): 1218-21.
- Dressman, D., H. Yan, et al. (2003). "Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(15): 8817-22.

E

- Ebert, A. D., J. Yu, et al. (2009). "Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient." *Nature* 457(7227): 277-80.
- Eikenboom, J., L. Hilbert, et al. (2009). "Expression of 14 von Willebrand factor mutations identified in patients with type 1 von Willebrand disease from the MCMDM-1VWD study." *J Thromb Haemost* 7(8): 1304-12.
- Eikenboom, J., V. Van Marion, et al. (2006). "Linkage analysis in families diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 VWD." *J Thromb Haemost* 4(4): 774-82.
- Eikenboom, J. C., T. Vink, et al. (1994). "Multiple substitutions in the von Willebrand factor gene that mimic the pseudogene sequence." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(6): 2221-4.
- Eswar, N., B. Webb, et al. (2007). "Comparative protein structure modeling using MODELLER." *Curr Protoc Protein Sci Chapter 2: Unit 2 9*.

F

- Favaloro, E. J. (2002). "Clinical application of the PFA-100." *Curr Opin Hematol* 9(5): 407-15.
- Favaloro, E. J., M. Aboud, et al. (2001). "Possibility of potential VWD misdiagnosis or misclassification using LIA technology and due to presence of rheumatoid factor." *Am J Hematol* 66(1): 53-6.
- Favaloro, E. J., R. Bonar, et al. (2004). "Laboratory diagnosis of von Willebrand's disorder: quality and diagnostic improvements driven by peer review in a multilaboratory test process." *Haemophilia* 10(3): 232-42.
- Fay, P. J., Y. Kawai, et al. (1986). "Propolypeptide of von Willebrand factor circulates in blood and is identical to von Willebrand antigen II." *Science* 232(4753): 995-8.
- Federici, A. B., E. Berntorp, et al. (2006). "The 80th anniversary of von Willebrand's disease: history, management and research." *Haemophilia* 12(6): 563-72.
- Federici, A. B., P. M. Mannucci, et al. (2009). "Clinical and molecular predictors of thrombocytopenia and risk of bleeding in patients with von Willebrand disease type 2B: a cohort study of 67 patients." *Blood* 113(3): 526-34.
- Federici, A. B., C. Mazurier, et al. (2004). "Biologic response to desmopressin in patients with severe type 1 and type 2 von Willebrand disease: results of a multicenter European study." *Blood* 103(6): 2032-8.

REFERÈNCIES

- Fedurco, M., A. Romieu, et al. (2006). "BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies." *Nucleic Acids Res* 34(3): e22.
- Fink, L., H. Holschermann, et al. (2003). "Characterization of platelet-specific mRNA by real-time PCR after laser-assisted microdissection." *Thromb Haemost* 90(4): 749-56.
- Fischer, S. G. and L. S. Lerman (1980). "Separation of random fragments of DNA according to properties of their sequences." *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(8): 4420-4.
- Fischer, S. G. and L. S. Lerman (1983). "DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory." *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(6): 1579-83.
- Fujimura, Y., K. Titani, et al. (1987). "A heparin-binding domain of human von Willebrand factor. Characterization and localization to a tryptic fragment extending from amino acid residue Val-449 to Lys-728." *J Biol Chem* 262(4): 1734-9.

G

- Gallinaro, L., F. Sartorello, et al. (2006). "Combined partial exon skipping and cryptic splice site activation as a new molecular mechanism for recessive type 1 von Willebrand disease." *Thromb Haemost* 96(6): 711-6.
- Ganguly, A., M. J. Rock, et al. (1993). "Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(21): 10325-9.
- Gill, J. C., J. Endres-Brooks, et al. (1987). "The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease." *Blood* 69(6): 1691-5.
- Gille, J. J., F. B. Hogervorst, et al. (2002). "Genomic deletions of MSH2 and MLH1 in colorectal cancer families detected by a novel mutation detection approach." *Br J Cancer* 87(8): 892-7.
- Ginsburg, D., R. I. Handin, et al. (1985). "Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization." *Science* 228(4706): 1401-6.
- Ginsburg, D. and J. E. Sadler (1993). "von Willebrand disease: a database of point mutations, insertions, and deletions. For the Consortium on von Willebrand Factor Mutations and Polymorphisms, and the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and

- Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis." *Thromb Haemost* 69(2): 177-84.
- Goodeve, A., J. Eikenboom, et al. (2007). "Phenotype and genotype of a cohort of families historically diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 von Willebrand Disease (MCMDM-1VWD)." *Blood* 109(1): 112-21.
- Goodeve, A. C. (1998). "Laboratory methods for the genetic diagnosis of bleeding disorders." *Clin Lab Haematol* 20(1): 3-19.
- Goodeve, A. C. (2010). "The genetic basis of von Willebrand disease." *Blood Rev.*
- Gupta, P. K. (2008). "Single-molecule DNA sequencing technologies for future genomics research." *Trends Biotechnol* 26(11): 602-11.
- Gupta, P. K., E. Adamtziki, et al. (2005). "Gene conversions are a common cause of von Willebrand disease." *Br J Haematol* 130(5): 752-8.
- Gupta, P. K., R. Saxena, et al. (2008). "Genetic defects in von Willebrand disease type 3 in Indian and Greek patients." *Blood Cells Mol Dis* 41(2): 219-22.

H

- Haberichter, S. L., M. Balistreri, et al. (2006). "Assay of the von Willebrand factor (VWF) propeptide to identify patients with type 1 von Willebrand disease with decreased VWF survival." *Blood* 108(10): 3344-51.
- Hashemi Soteh, M., I. R. Peake, et al. (2007). "Mutational analysis of the von Willebrand factor gene in type 1 von Willebrand disease using conformation sensitive gel electrophoresis: a comparison of fluorescent and manual techniques." *Haematologica* 92(4): 550-3.
- Hilbert, L., C. Gaucher, et al. (1995). "Identification of two mutations (Arg611Cys and Arg611His) in the A1 loop of von Willebrand factor (vWF) responsible for type 2 von Willebrand disease with decreased platelet-dependent function of vWF." *Blood* 86(3): 1010-8.
- Hilbert, L., S. Jorieux, et al. (2004). "Expression of two type 2N von Willebrand disease mutations identified in exon 18 of von Willebrand factor gene." *Br J Haematol* 127(2): 184-9.
- Holmberg, L. and I. M. Nilsson (1992). "von Willebrand's disease." *Eur J Haematol* 48(3): 127-41.
- Houdayer, C., C. Dehainault, et al. (2008). "Evaluation of in silico splice tools for decision-making in molecular diagnosis." *Hum Mutat* 29(7): 975-82.

REFERÈNCIES

Howard, M. A. and B. G. Firkin (1971). "Ristocetin--a new tool in the investigation of platelet aggregation." *Thromb Diath Haemorrh* 26(2): 362-9.

I

Isken, O. and L. E. Maquat (2007). "Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function." *Genes Dev* 21(15): 1833-56.

J

Jaffe, E. A., L. W. Hoyer, et al. (1974). "Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 71(5): 1906-9.

James, P. D., C. Notley, et al. (2007). "The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease: Results from a Canadian cohort study." *Blood* 109(1): 145-54.

Johnsen, J. M., M. Teschke, et al. (2009). "Selection on cis-regulatory variation at *B4galnt2* and its influence on von Willebrand factor in house mice." *Mol Biol Evol* 26(3): 567-78.

K

Kakela, J. K., K. D. Friedman, et al. (2006). "Genetic mutations in von Willebrand disease identified by DHPLC and DNA sequence analysis." *Mol Genet Metab* 87(3): 262-71.

Kasatkar, P., S. Shetty, et al. (2010). "VWF pseudogene: Mimics, masks and spoils." *Clin Chim Acta* 411(7-8): 607-9.

Kaye, J. A. (1996). "The clinical development of recombinant human interleukin 11 (NEUMEGA rhIL-11 growth factor)." *Stem Cells* 14 Suppl 1: 256-60.

Keeney, S., D. Bowen, et al. (2008). "The molecular analysis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organisation Haemophilia Genetics Laboratory Network." *Haemophilia* 14(5): 1099-111.

Keeney, S., A. Cumming, et al. (1999). "Mutations in von Willebrand factor multimerization domains are not a common cause of classical type 1 von Willebrand disease." *Thromb Haemost* 82(5): 1446-50.

Keeney, S. and A. M. Cumming (2001). "The molecular biology of von Willebrand disease." *Clin Lab Haematol* 23(4): 209-30.

- Kingman, C. E., R. A. Kadir, et al. (2004). "The use of levonorgestrel-releasing intrauterine system for treatment of menorrhagia in women with inherited bleeding disorders." *Bjog* 111(12): 1425-8.
- Kolata, G. (1985). "Clotting protein cloned." *Science* 228(4706): 1415-7.
- Korlach, J., K. P. Bjornson, et al. (2010). "Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules." *Methods Enzymol* 472: 431-55.
- Kouides, P. A. (2008). "Bleeding symptom assessment and hemostasis evaluation of menorrhagia." *Curr Opin Hematol* 15(5): 465-72.
- Kuwano, A., Y. Morimoto, et al. (1996). "Precise chromosomal locations of the genes for dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA), von Willebrand factor (F8vWF) and parathyroid hormone-like hormone (PTH LH) in human chromosome 12p by deletion mapping." *Hum Genet* 97(1): 95-8.

L

- Laffan, M., S. A. Brown, et al. (2004). "The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization." *Haemophilia* 10(3): 199-217.
- Laurel, M. J. (1953). "[Newly identified hemorrhagic syndromes.]" *Rev Hematol* 8(3): 374-86.
- Lee, C. A. (2010). Chapter 43. von Willebrand Disease: Epidemiology. *Textbook of Hemophilia*. Wiley.
- Lemmerhirt, H. L., K. W. Broman, et al. (2007). "Genetic regulation of plasma von Willebrand factor levels: quantitative trait loci analysis in a mouse model." *J Thromb Haemost* 5(2): 329-35.
- Lenting, P. J., J. A. van Mourik, et al. (1998). "The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function." *Blood* 92(11): 3983-96.
- Levy, G. and D. Ginsburg (2001). "Getting at the variable expressivity of von Willebrand disease." *Thromb Haemost* 86(1): 144-8.
- Levy, G. G., D. G. Motto, et al. (2005). "ADAMTS13 turns 3." *Blood* 106(1): 11-7.
- Lewis, B. P., R. E. Green, et al. (2003). "Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(1): 189-92.
- Lillicrap, D. (2008). "The basic science, diagnosis, and clinical management of von Willebrand disease." *World Federation of Hemophilia* 35: 11.

REFERÈNCIES

- Lopez-Fernandez, M. F., M. J. Blanco-Lopez, et al. (1992). "Further evidence for recessive inheritance of von Willebrand disease with abnormal binding of von Willebrand factor to factor VIII." *Am J Hematol* 40(1): 20-7.
- Lopez-Fernandez, M. F., R. Gonzalez-Boullosa, et al. (1991). "Abnormal proteolytic degradation of von Willebrand factor after desmopressin infusion in a new subtype of von Willebrand disease (ID)." *Am J Hematol* 36(3): 163-70.
- Luan, B., H. Peng, et al. (2010). "Base-by-base ratcheting of single stranded DNA through a solid-state nanopore." *Phys Rev Lett* 104(23): 238103.

M

- Mancuso, D. J., E. A. Tuley, et al. (1991). "Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction." *Biochemistry* 30(1): 253-69.
- Mancuso, D. J., E. A. Tuley, et al. (1989). "Structure of the gene for human von Willebrand factor." *J Biol Chem* 264(33): 19514-27.
- Mannucci, P. M. (1998). "Hemostatic drugs." *N Engl J Med* 339(4): 245-53.
- Mannucci, P. M. (2001). "How I treat patients with von Willebrand disease." *Blood* 97(7): 1915-9.
- Mannucci, P. M. (2004). "Treatment of von Willebrand's Disease." *N Engl J Med* 351(7): 683-94.
- Mannucci, P. M., J. Chediak, et al. (2002). "Treatment of von Willebrand disease with a high-purity factor VIII/von Willebrand factor concentrate: a prospective, multicenter study." *Blood* 99(2): 450-6.
- Mannucci, P. M. and E. G. Tuddenham (2001). "The hemophilias--from royal genes to gene therapy." *N Engl J Med* 344(23): 1773-9.
- Maquat, L. (2000). Nonsense-mediated RNA decay in mammalian cells: a splicing-dependent means to down-regulate the levels of mRNAs that prematurely terminate translation. *Translational control of gene expression*. C. S. H. Press. New York: 849-68.
- Mardis, E. R. (2008). "The impact of next-generation sequencing technology on genetics." *Trends Genet* 24(3): 133-41.
- Margulies, M., M. Egholm, et al. (2005). "Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors." *Nature* 437(7057): 376-80.
- Marti, T., S. J. Rosselet, et al. (1987). "Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor." *Biochemistry* 26(25): 8099-109.

- Mazurier, C., C. Gaucher, et al. (1994). "Biological effect of desmopressin in eight patients with type 2N ('Normandy') von Willebrand disease. Collaborative Group." *Br J Haematol* 88(4): 849-54.
- Mazurier, C., J. Goudemand, et al. (2001). "Type 2N von Willebrand disease: clinical manifestations, pathophysiology, laboratory diagnosis and molecular biology." *Best Pract Res Clin Haematol* 14(2): 337-47.
- McPherson, J. D. (2009). "Next-generation gap." *Nat Methods* 6(11 Suppl): S2-5.
- McVey, J. H., E. J. Boswell, et al. (1998). "Exclusion of the first EGF domain of factor VII by a splice site mutation causes lethal factor VII deficiency." *Blood* 92(3): 920-6.
- Mendolicchio, G. L. and Z. M. Ruggeri (2005). "New perspectives on von Willebrand factor functions in hemostasis and thrombosis." *Semin Hematol* 42(1): 5-14.
- Mertes, G., M. Ludwig, et al. (1994). "A G+3-to-T donor splice site mutation leads to skipping of exon 50 in von Willebrand factor mRNA." *Genomics* 24(1): 190-1.
- Metzker, M. L. (2010). "Sequencing technologies - the next generation." *Nat Rev Genet* 11(1): 31-46.
- Meyer, D., E. Fressinaud, et al. (1997). "Gene defects in 150 unrelated French cases with type 2 von Willebrand disease: from the patient to the gene. INSERM Network on Molecular Abnormalities in von Willebrand Disease." *Thromb Haemost* 78(1): 451-6.
- Meyer, D., G. Pietu, et al. (1991). "von Willebrand factor: structure and function." *Mayo Clin Proc* 66(5): 516-23.
- Michiels, J. J., Z. Berneman, et al. (2006). "Classification and characterization of hereditary types 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2M, 2N, and 2U (unclassifiable) von Willebrand disease." *Clin Appl Thromb Hemost* 12(4): 397-420.
- Millar, C. M., A. F. Riddell, et al. (2008). "Survival of von Willebrand factor released following DDAVP in a type 1 von Willebrand disease cohort: influence of glycosylation, proteolysis and gene mutations." *Thromb Haemost* 99(5): 916-24.
- Miller, C. H., J. B. Graham, et al. (1979). "Genetics of classic von Willebrand's disease. I. Phenotypic variation within families." *Blood* 54(1): 117-36.
- Moake, J. L. (2004). "von Willebrand factor, ADAMTS-13, and thrombotic thrombocytopenic purpura." *Semin Hematol* 41(1): 4-14.

REFERÈNCIES

N

- Ng, P. C. and S. Henikoff (2002). "Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein function." *Genome Res* 12(3): 436-46.
- Ni, X., J. Guo, et al. (2000). "Prenatal determination of a variable number of tandem repeats in intron 40 of the von Willebrand factor gene from maternal peripheral blood using the polymerase chain reaction." *Hum Hered* 50(3): 201-4.
- Nichols, W. C. and D. Ginsburg (1997). "von Willebrand disease." *Medicine (Baltimore)* 76(1): 1-20.
- Nilsson, I. M., M. Blomback, et al. (1957). "Von Willebrand's disease and its correction with human plasma fraction 1-0." *Acta Med Scand* 159(3): 179-88.
- Nilsson, I. M., M. Blomback, et al. (1957). "On an inherited autosomal hemorrhagic diathesis with antihemophilic globulin (AHG) deficiency and prolonged bleeding time." *Acta Med Scand* 159(1): 35-57.

O

- O'Brien, L. A., P. D. James, et al. (2003). "Founder von Willebrand factor haplotype associated with type 1 von Willebrand disease." *Blood* 102(2): 549-57.
- O'Brien, L. A., J. J. Sutherland, et al. (2004). "A novel type 2A (Group II) von Willebrand disease mutation (L1503Q) associated with loss of the highest molecular weight von Willebrand factor multimers." *J Thromb Haemost* 2(7): 1135-42.
- Oefner, P. J., C. G. Huber, et al. (1994). "High-resolution liquid chromatography of fluorescent dye-labeled nucleic acids." *Anal Biochem* 223(1): 39-46.
- Orita, M., H. Iwahana, et al. (1989). "Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(8): 2766-70.
- Ota, M., H. Asamura, et al. (2009). "Restriction enzyme analysis of PCR products." *Methods Mol Biol* 578: 405-14.
- Othman, M., C. Notley, et al. (2005). "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* 105(11): 4330-6.

P

- Patracchini, P., E. Calzolari, et al. (1989). "Sublocalization of von Willebrand factor pseudogene to 22q11.22-q11.23 by in situ hybridization in a 46,X,t(X;22)(pter;q11.21) translocation." *Hum Genet* 83(3): 264-6.
- Pena, S. D., K. T. de Souza, et al. (1994). "Allelic associations of two polymorphic microsatellites in intron 40 of the human von Willebrand factor gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(2): 723-7.
- Penas, N., A. Perez, et al. (2004). "C1272S: a new candidate mutation in type 2A von Willebrand disease that disrupts the disulfide loop responsible for the interaction of VWF with platelet GP Ib-IX." *Am J Hematol* 75(2): 73-7.
- Pennisi, E. (2010). "Genomics. 1000 Genomes Project gives new map of genetic diversity." *Science* 330(6004): 574-5.
- Perlea, M., X. Lin, et al. (2001). "GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction." *Nucleic Acids Res* 29(5): 1185-90.
- Pillet, N. and D. F. Schorderet (1994). "[Diagnosis using PCR: the indirect approach]." *Schweiz Rundsch Med Prax* 83(20): 599-603.
- Plate, M., S. Duga, et al. (2010). "Premature termination codon mutations in the von Willebrand factor gene are associated with allele-specific and position-dependent mRNA decay." *Haematologica* 95(1): 172-4.
- Posan, E., R. D. McBane, et al. (2003). "Comparison of PFA-100 testing and bleeding time for detecting platelet hypofunction and von Willebrand disease in clinical practice." *Thromb Haemost* 90(3): 483-90.
- Prokop, M., J. Adam, et al. (2008). "TRITON: a graphical tool for ligand-binding protein engineering." *Bioinformatics* 24(17): 1955-6.
- Pruthi, R. K. (2006). "A practical approach to genetic testing for von Willebrand disease." *Mayo Clin Proc* 81(5): 679-91.
- Pushkarev, D., N. F. Neff, et al. (2009). "Single-molecule sequencing of an individual human genome." *Nat Biotechnol* 27(9): 847-52.

Q

- Quick, A. (1953). *J Lab Clin Med* 42: 929-30.

REFERÈNCIES

Quiroga, T., M. Goycoolea, et al. (2004). "Template bleeding time and PFA-100 have low sensitivity to screen patients with hereditary mucocutaneous hemorrhages: comparative study in 148 patients." *J Thromb Haemost* 2(6): 892-8.

R

Ramensky, V., P. Bork, et al. (2002). "Human non-synonymous SNPs: server and survey." *Nucleic Acids Res* 30(17): 3894-900.

Raya, A., I. Rodriguez-Piza, et al. (2009). "Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells." *Nature* 460(7251): 53-9.

Raya, A., I. Rodriguez-Piza, et al. (2010). "A protocol describing the genetic correction of somatic human cells and subsequent generation of iPS cells." *Nat Protoc* 5(4): 647-60.

Reese, M. G., F. H. Eeckman, et al. (1997). "Improved splice site detection in Genie." *J Comput Biol* 4(3): 311-23.

Rendal, E., N. Penas, et al. (2001). "Type 2B von Willebrand's disease due to Val1316Met mutation. Heterogeneity in the same sibship." *Ann Hematol* 80(6): 354-60.

Ribba, A. S., J. M. Lavergne, et al. (1991). "Duplication of a methionine within the glycoprotein Ib binding domain of von Willebrand factor detected by denaturing gradient gel electrophoresis in a patient with type IIB von Willebrand disease." *Blood* 78(7): 1738-43.

Rob Elles, R. M. (2004). *Molecular diagnosis of genetic diseases*

Roberts, R. G., D. R. Bentley, et al. (1993). "Infidelity in the structure of ectopic transcripts: a novel exon in lymphocyte dystrophin transcripts." *Hum Mutat* 2(4): 293-9.

Rodeghiero, F., G. Castaman, et al. (1987). "Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease." *Blood* 69(2): 454-9.

Rodeghiero, F., G. Castaman, et al. (2005). "The discriminant power of bleeding history for the diagnosis of type 1 von Willebrand disease: an international, multicenter study." *J Thromb Haemost* 3(12): 2619-26.

Rogaev, E. I., A. P. Grigorenko, et al. (2009). "Genotype analysis identifies the cause of the "royal disease"." *Science* 326(5954): 817.

S

Sadler, J. E. (1998). "Biochemistry and genetics of von Willebrand factor." *Annu Rev Biochem* 67: 395-424.

- Sadler, J. E., U. Budde, et al. (2006). "Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor." *J Thromb Haemost* 4(10): 2103-14.
- Sadler, J. E. and D. Ginsburg (1993). "A database of polymorphisms in the von Willebrand factor gene and pseudogene. For the Consortium on von Willebrand Factor Mutations and Polymorphisms and the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis." *Thromb Haemost* 69(2): 185-91.
- Sadler, J. E., P. M. Mannucci, et al. (2000). "Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand disease." *Thromb Haemost* 84(2): 160-74.
- Sadler, J. E. and F. Rodeghiero (2005). "Provisional criteria for the diagnosis of VWD type 1." *J Thromb Haemost* 3(4): 775-7.
- Sadler, J. E., B. B. Shelton-Inloes, et al. (1985). "Cloning and characterization of two cDNAs coding for human von Willebrand factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(19): 6394-8.
- Saenko, E. L. and D. Scandella (1997). "The acidic region of the factor VIII light chain and the C2 domain together form the high affinity binding site for von willebrand factor." *J Biol Chem* 272(29): 18007-14.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-7.
- Savage, B., E. Saldivar, et al. (1996). "Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor." *Cell* 84(2): 289-97.
- Schneppenheim, R., U. Budde, et al. (1996). "Results of a screening for von Willebrand disease type 2N in patients with suspected haemophilia A or von Willebrand disease type 1." *Thromb Haemost* 76(4): 598-602.
- Schneppenheim, R., G. Castaman, et al. (2007). "A common 253-kb deletion involving VWF and TMEM16B in German and Italian patients with severe von Willebrand disease type 3." *J Thromb Haemost* 5(4): 722-8.
- Schwarz, H. P., U. Schlokot, et al. (2002). "Recombinant von Willebrand factor-insight into structure and function through infusion studies in animals with severe von Willebrand disease." *Semin Thromb Hemost* 28(2): 215-26.
- Schwarz, H. P., P. L. Turecek, et al. (1997). "Recombinant von Willebrand factor." *Thromb Haemost* 78(1): 571-6.

REFERÈNCIES

- Seeliger, D. and B. L. de Groot (2010). "Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina." *J Comput Aided Mol Des* 24(5): 417-22.
- Shapiro, G. A., J. C. Andersen, et al. (1973). "The subunit structure of normal and hemophilic factor VIII." *J Clin Invest* 52(9): 2198-210.
- Shavit, J. A., A. Manichaikul, et al. (2009). "Modifiers of von Willebrand factor identified by natural variation in inbred strains of mice." *Blood* 114(26): 5368-74.
- Shelton-Inloes, B. B., K. Titani, et al. (1986). "cDNA sequences for human von Willebrand factor reveal five types of repeated domains and five possible protein sequence polymorphisms." *Biochemistry* 25(11): 3164-71.
- Silva, A. L. and L. Romao (2009). "The mammalian nonsense-mediated mRNA decay pathway: to decay or not to decay! Which players make the decision?" *FEBS Lett* 583(3): 499-505.
- Souto, J. C., L. Almasy, et al. (2003). "Genome-wide linkage analysis of von Willebrand factor plasma levels: results from the GAIT project." *Thromb Haemost* 89(3): 468-74.
- Sporn, L. A., S. I. Chavin, et al. (1985). "Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes." *J Clin Invest* 76(3): 1102-6.
- Sporn, L. A., V. J. Marder, et al. (1986). "Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers." *Cell* 46(2): 185-90.
- Sutherland, M. S., S. Keeney, et al. (2009). "The mutation spectrum associated with type 3 von Willebrand disease in a cohort of patients from the north west of England." *Haemophilia* 15(5): 1048-57.

T

- Tchernitchko, D., M. Goossens, et al. (2004). "In silico prediction of the deleterious effect of a mutation: proceed with caution in clinical genetics." *Clin Chem* 50(11): 1974-8.
- Tosetto, A., F. Rodeghiero, et al. (2006). "A quantitative analysis of bleeding symptoms in type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study (MCMDM-1 VWD)." *J Thromb Haemost* 4(4): 766-73.
- Tsai, H. M. (2003). "Shear stress and von Willebrand factor in health and disease." *Semin Thromb Hemost* 29(5): 479-88.
- Turecek, P. L., H. Gritsch, et al. (1997). "In vivo characterization of recombinant von Willebrand factor in dogs with von Willebrand disease." *Blood* 90(9): 3555-67.

V

- Valouev, A., J. Ichikawa, et al. (2008). "A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning." *Genome Res* 18(7): 1051-63.
- Vasudevan, S., J. R. Roberts, et al. (2000). "Modeling and functional analysis of the interaction between von Willebrand factor A1 domain and glycoprotein Ibalpha." *J Biol Chem* 275(17): 12763-8.
- Verweij, C. L., C. J. de Vries, et al. (1985). "Construction of cDNA coding for human von Willebrand factor using antibody probes for colony-screening and mapping of the chromosomal gene." *Nucleic Acids Res* 13(13): 4699-717.
- Vidal, F., E. Farssac, et al. (2000). "Factor IX gene sequencing by a simple and sensitive 15-hour procedure for haemophilia B diagnosis: identification of two novel mutations." *Br J Haematol* 111(2): 549-51.
- Vidal, F., E. Farssac, et al. (2001). "Rapid hemophilia A molecular diagnosis by a simple DNA sequencing procedure: identification of 14 novel mutations." *Thromb Haemost* 85(4): 580-3.
- Vidal, F., A. Julia, et al. (2005). "Von Willebrand gene tracking by single-tube automated fluorescent analysis of four short tandem repeat polymorphisms." *Thromb Haemost* 93(5): 976-81.
- Vlot, A. J., S. J. Koppelman, et al. (1995). "The affinity and stoichiometry of binding of human factor VIII to von Willebrand factor." *Blood* 85(11): 3150-7.
- Von Willebrand, E. A. (1926). Hereditary pseudohaemophilia. *Finska Lakarsallskapet*. 67: 7-112.
- VWFdb. (2010). "International Society on Thrombosis and Haemostasis Scientific and Standardization Committee VWF Information Homepage."

W

- Wahlberg, T. B., M. Blomback, et al. (1984). "Influence of sex, blood group, secretor character, smoking habits, acetylsalicylic acid, oral contraceptives, fasting and general health state on blood coagulation variables in randomly selected young adults." *Haemostasis* 14(4): 312-9.
- Weiss, H. J., L. W. Hoyer, et al. (1973). "Quantitative assay of a plasma factor deficient in von Willebrand's disease that is necessary for platelet aggregation. Relationship to factor VIII procoagulant activity and antigen content." *J Clin Invest* 52(11): 2708-16.

REFERÈNCIES

Z

- Zatkova, A., L. Messiaen, et al. (2004). "Disruption of exonic splicing enhancer elements is the principal cause of exon skipping associated with seven nonsense or missense alleles of NF1." *Hum Mutat* 24(6): 491-501.
- Zhang, Z., M. Lindstedt, et al. (1995). "Effects of the mutant von Willebrand factor gene in von Willebrand disease." *Hum Genet* 96(4): 388-94.
- Zhang, Z. P., M. Blomback, et al. (1994). "Characterization of the von Willebrand factor gene (VWF) in von Willebrand disease type III patients from 24 families of Swedish and Finnish origin." *Genomics* 21(1): 188-93.
- Zhang, Z. P., L. P. Deng, et al. (1992). "Dinucleotide repeat polymorphism in the promoter region of the human von Willebrand factor gene (vWF gene)." *Hum Mol Genet* 1(9): 780.
- Zhou, Z., T. C. Nguyen, et al. (2010). "Von Willebrand factor, ADAMTS-13, and thrombotic thrombocytopenic purpura." *Semin Thromb Hemost* 36(1): 71-81.

Annex

No tenía miedo a las dificultades: lo que la asustaba era la obligación de tener que escoger un camino. Escoger un camino significaba abandonar otros.

Brida
Paulo Coelho



Annex



1. Qüestionari pel diagnòstic de la VWD de tipus 1 (BS)
2. Test de valoració de les menorràgies
3. Åland Conference
4. "Hereditary Pseudothaemophilia". Finska Läkaresällskapetets Handlingar. Erik von Willebrand 1926.

1. Qüestionari pel Diagnòstic de la VWD tipus 1

(MCMDM-1vWD, score >0)

Nom:	Data Naix:
Epistaxi	0 = no o trivial (inferior a 5) 1 = present (>5 o més de 10') 2 = consulta mèdica 3 = tap, cauterització o antifibrinolític 4 = transfusió sanguínia, teràpia de reemplaçament o desmopresina
Cutanis	0 = no o trivial (<1cm) 1 = present (>1cm sense trauma) 2 = consulta mèdica
Sagnat per ferides menors	0 = no o trivial (menys de 5) 1 = present (>5 o més de 5') 2 = consulta mèdica 3 = hemostàsia quirúrgica 4 = transfusió sanguínia, teràpia de reemplaçament o desmopresina
Cavitat oral	0 = no 1 = present (al menys 1) 2 = consulta mèdica 3 = hemostàsia quirúrgica o antifibrinolític 4 = transfusió sanguínia, teràpia de reemplaçament o desmopresina
Sagnat gastrointestinal	0 = no 1 = associada a úlcera, hipertensió portal, hemorroides, angiodisplàsia 2 = espontània 3 = hemostàsia quirúrgica, transfusió sanguínia, teràpia de reemplaçament, desmopresina, antifibrinolític
Extracció dental	-1= sense sagnat en al menys 2 extraccions 0 = sense extracció o sense sagnat en 1 extracció 1 = present en <25% de tots els procediments 2 = present en >25% de tots els procediments, sense intervenció 3 = resutura o tap 4 = transfusió sanguínia, teràpia de reemplaçament o desmopresina
Cirurgia	-1= sense sagnat en al menys 2 cirugies 0 = sense cirurgia o sense sagnat en 1 cirurgia 1 = present en <25% de totes les cirugies 2 = present en >25% de tots els procediments, sense intervenció 3 = hemostàsia quirúrgica o antifibrinolític 4 = transfusió sanguínia, teràpia de reemplaçament o desmopresina




ANNEX




Menorràgia	0 = no o trivial 1 = present, puntuació test >100 2 = antifibrinolítics, ús d'anticonceptius 3 = dilatació i curetatge, teràpia de ferro 4 = transfusió sanguínia, teràpia de reemplaçament, desmopresina o histerectomia
Hemorràgia postpart	-1 = sense sagnat en al menys 2 parts 0 = sense part o sense sagnat en 1 part 1 = amb sagnat post-part 2 = dilatació i curetatge, teràpia de ferro, antifibrinolítics 3 = transfusió sanguínia, teràpia de reemplaçament o desmopresina 4 = histerectomia
Hematomes musculars	0 = mai 1 = post trauma sense teràpia 2 = espontània sense teràpia 3 = espontània o traumàtica amb desmopresina o teràpia de reemplaçament 4 = espontània o traumàtica amb cirurgia o transfusió sanguínia
Hemartrosi	0 = mai 1 = post trauma sense teràpia 2 = espontània sense teràpia 3 = espontània o traumàtica amb desmopresina o teràpia de reemplaçament 4 = espontània o traumàtica amb cirurgia o transfusió sanguínia
Sagnat del sistema nerviós central	0 = mai 3 = subdural, sense intervenció 4 = intracerebral, sense intervenció

Puntuació final

Signatura:

2. Test de valoració de les menorràgies

Compresa		1	2	3	4	5	6	7	8
1									
5									
20									
Coalls sí / no									

Tampó		1	2	3	4	5	6	7	8
1									
5									
10									
Coalls sí / no									

Puntuació final

Signatura:



140TH Anniversary

Erik von Willebrand, 1870 –1949

ÅLAND CONFERENCE
22-25 SEPTEMBER 2010
VON WILLEBRAND DISEASE

CONFERENCE PROGRAM



octapharma

For the safe and optimal use of human proteins

Åland Conference

No vull acabar aquesta tesi doctoral sense plasmar l'experiència d'haver participat a la reunió de les illes Åland. He tingut la gran sort de formar part dels pocs afortunats que han pogut palpar la història de la malaltia amb la que treballen, d'anar als orígens on tot va començar i de conèixer gent directament implicada amb els seus inicis.

Els dies 24 i 25 de Setembre de 1998, es va organitzar la primera reunió sota el nom de *Nordic Symposium on von Willebrand disease*. Un grup de metges i científics dels Països Nòrdics que treballaven amb la VWD, van organitzar una reunió en el ferry que va des d'Estocolm fins a Mariehamn, a les illes Åland, amb l'objectiu de conèixer la casa on Erik von Willebrand va descriure els primers casos índex el 1926. L'objectiu de la reunió era realitzar un estudi exhaustiu de la situació de la VWD segons la perspectiva dels Països Nòrdics. Per tal de cobrir totes les àrees d'interès, també van ser convidats alguns científics destacats d'altres països. Un any més tard es va publicar un article amb les conclusions del simposi [Berntorp 1999].

La situació en la classificació i el diagnòstic de la VWD en aquell moment era molt diferent de l'actual. Fins 4 anys abans de la reunió, la classificació de la VWD plantejava un espectre clínic especialment complex ja que existien més de 20 subtipus diferents. Una nova classificació de Sadler del 1994, reconeixia la diferenciació acceptada actualment entre dèficits quantitius (tipus 1 i 3) i dèficits qualitius (tipus

ANNEX

2). Només un any abans de la reunió es descrivia l'efecte dels factors ambientals sobre la variabilitat dels nivells de VWF. Aleshores, la definició de la VWD requeria que la deficiència de VWF es trobés lligada a una anormalitat en el VWF. Les mutacions començaven a identificar-se a un ritme accelerat i ja es sospitaven les conseqüències en la classificació i la necessitat de crear subdivisions. En quant al diagnòstic, es feia evident la dificultat per identificar els casos lleus de VWD de tipus 1 i, a la reunió, es va destacar la necessitat de crear guies per definir els criteris per al diagnòstic del tipus 1. Es va acordar que aquests criteris tinguessin en compte la tendència hemorràgica, l'herència i els nivells plasmàtics de VWF reduïts respecte referents amb el mateix grup sanguini.

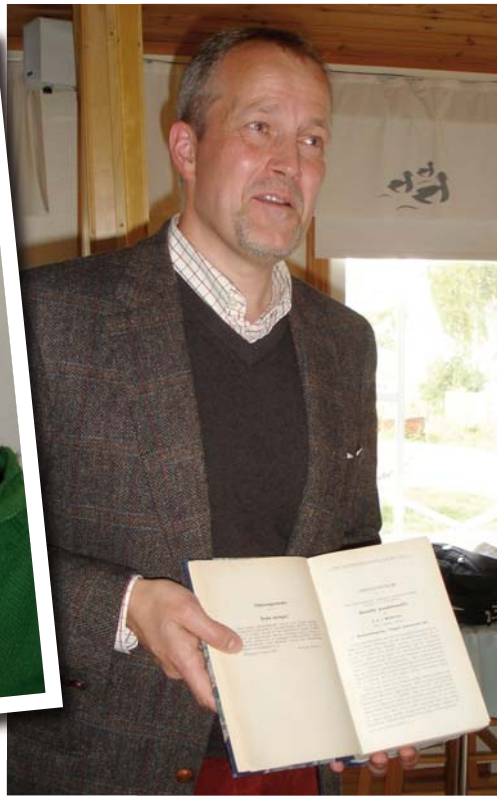
Enguany, dotze anys després de la primera reunió a les illes Åland, i en motiu del 140^e aniversari del naixement d'Erik von Willebrand, es va celebrar la Åland Conference del 22 al 25 de Setembre. La reunió convocava a gent especialitzada en la VWD d'arreu del món i la llista de participants era de 42. Aquest cop, els objectius es centraven en presentar i debatre els resultats en la recerca de la VWD a nivell de diagnòstic, clínica i terapèutica així com avaluar les guies de tractament actualment en funcionament i proposar possibles actualitzacions. D'entre totes les sessions programades m'agradaria destacar el seminari realitzat per Margareta Blömbäck, "Exciting experience in my research on VWD". Un relat en primera persona de les experiències viscudes en l'estudi d'aquesta malaltia. Va ser una història entranyable que posava cares i noms als primers passos realitzats en la comprensió de la VWD. Posteriorment, amb la participació d'Otto Lindberg amb "Erik von Willebrand – who was he?", vam poder conèixer detalls de la vida i l'experiència d'aquest personatge de la mà del seu besnét. Aquestes dues sessions, junt amb la visita a la casa de la família Sundblom a la illa de Föglö, i la possibilitat de conèixer i parlar amb la gent més important a nivell mundial en la recerca de la malaltia de von Willebrand van ser, per a mi, el més destacable d'aquesta reunió. En resum, una experiència inigualable en la que, al costat de la Dra. Carme Altisent, he tingut el privilegi de participar.



Participants que també havien assistit a la primera reunió de les Åland. A l'esquerra, trobem Margareta Blömback.



Participants de la Åland Conference davant la casa de la família Sundblom, a l'illa de Föglö, on Hjördis va viure i morir a causa de la malaltia que Erik von Willebrand va descriure el 1926.



Otto Lindberg, besnét d'Erik von Willebrand, amb la publicació original del Finska Läkaresällskapets Handlingar de 1926: "Hereditär Pseudoheophil"



CONFERENCE PROGRAM 22–25 SEPTEMBER

Wednesday - September 22

16.45 Ferry departure from Stockholm (CET)
17.00 Dinner on the ferry boat
18.00 Ferry session (see program below)
23.40 Arrival Mariehamn (CET+1h)
23.40 Transfer to hotel

Ferry session (Session I)

Topic: Biochemistry and immunology
Chair: Bob Montgomery

18.00 Welcome and introduction, Erik Berntorp, SWE
18.15 Progress in understanding VWD in the last 50 years?
Ian Peake, UK
18.45 Recent results from flow based VWF characterization,
Christoph Kannicht, GER
19.15 Multimers, Ulrich Budde, GER
19.45 VWF: glycosylation and function, Mike Laffan, UK
20.15 Discussion
20.45 End of session and welcome drinks/snack

Thursday - September 23

Morning session (Session II)

Topic: Diagnosis, classification and genetics of VWD
Chair: David Lilicrap

08.00 Breakfast
09.30 Classification of VWD, Bob Montgomery, USA
10.00 Assays in VWD diagnostics, Andreas Hillarp, SWE
10.30 PK and assays - standard element of treatment?
Jerzy Windyga, PL
11.00 Break
11.15 Genetics of VWF, Anne Goodeve, UK
11.45 Modifier genes for von Willebrand Disease,
David Ginsburg, USA
12.00 Discussion
12.30 Lunch

Afternoon session (Session III)

Topic: Treatment and management of VWD
Chair: Flora Peyvandi

13.30 Treating the pediatric patient, Pia Petrini, SWE
14.00 Prophylaxis in VWD, Erik Berntorp, SWE
14.30 Break
15.00 Managing surgeries and interventions,
Mario v. Depka-Prod., GER
15.30 When VWD comes into age – VWD in geriatrics,
Wolfgang Miesbach, GER
16.00 Discussion

Special pre-dinner lecture

18.00 Gene therapy for von Willebrand Disease: one step
at a time, David Lilicrap, CAN
18.40 Dinner

Friday - September 24

Excursion to Föglö Islands

06.00 Breakfast
07.00 Bus transfer to Föglö Islands (ferry departure 8.25)
09.30 Visit to Hjärdís house
10.30 Transfer to restaurant
11.00 Exciting experience in my research on VWD (with coffee
buffet), Margareta Blombäck, SWE
11.30 Erik von Willebrand - who was he? Otto Lindberg (great-
grandson of Erik von Willebrand), FIN
12.00 Lunch
13.00 Ferry departure from Föglö

Afternoon Session (Session IV)

Topic: Treatment and management of VWD II
Chair: John Pasi

14.30 Coffee
15.00 Gynecological aspects of VWD, Christine Lee, UK
15.30 Concentrates: industrial perspective, Jürgen Roemisch, AT
16.00 Phenotypic and molecular background of VWD type 2A
subtype 2E, Reinhard Schneppenheim, GER
16.30 Break
17.00 Role of FVIII in VWF replacement, Erik Berntorp, SWE
17.30 Inhibitors in VWD, Augusto Federici, IT
18.00 Discussion
19.00 Dinner

Saturday - September 25

Morning session (Session V) - part I

Topic: Current guidelines and recommendations
Chair: Gil White

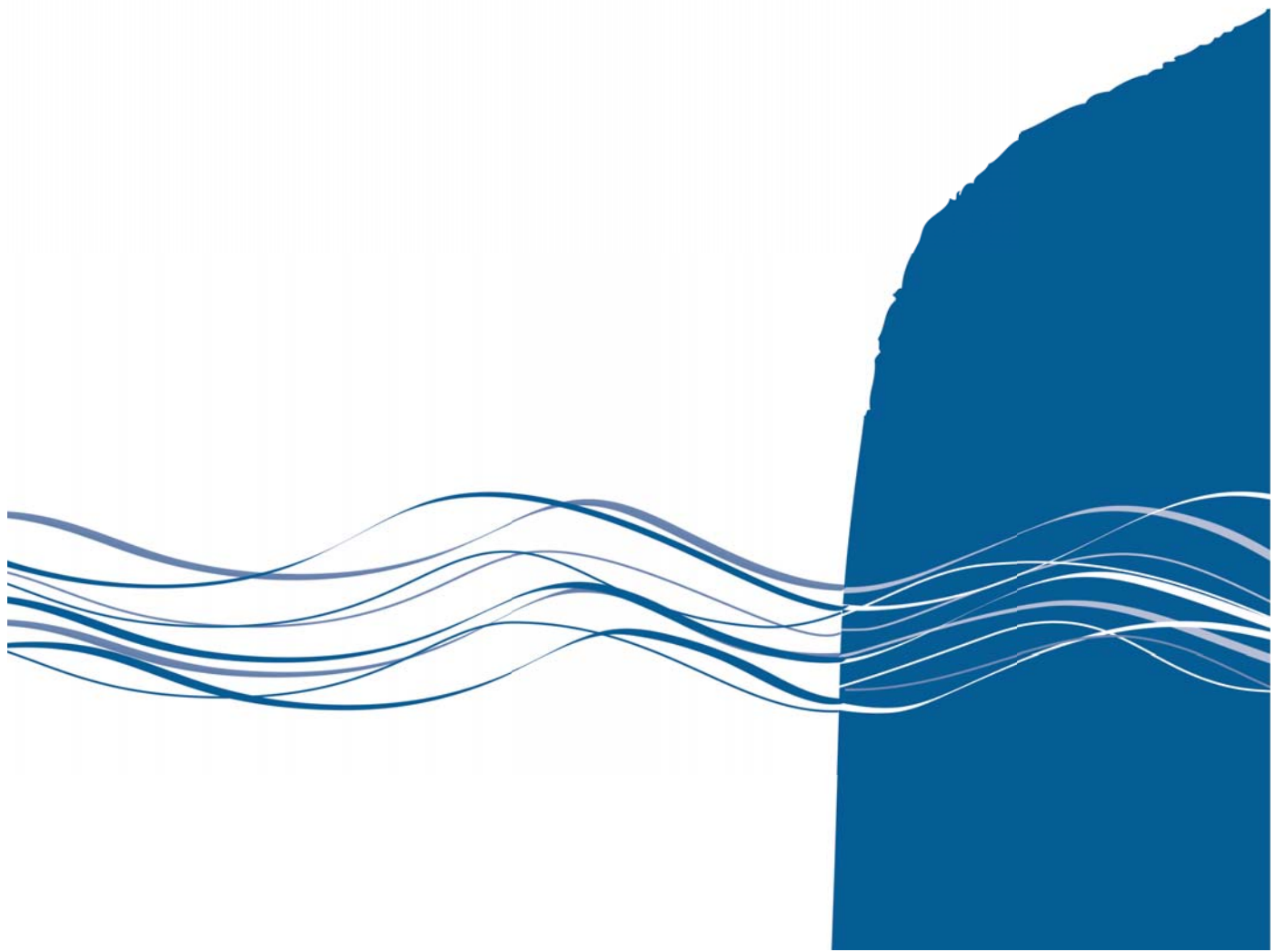
07.00 Breakfast
08.00 Current treatment guidelines – experiences from UK,
Mike Laffan, UK
08.20 Current treatment guidelines – experiences from
Scandinavia, Riitta Lassila, FIN
08.40 Current treatment guidelines – experiences from USA,
Gil White, USA
09.00 WFH activities on global recommendations,
Alison Street, AUS
09.20 Break and checkout

Morning session (Session V) - part II

Topic: Impact of the outcomes to guidelines and next steps
Chair: Erik Berntorp

09.40 Conclusions and remarks, installation of "Åland Island
Committee" to publish and promote the results of the
meeting and to develop treatment recommendations
further, Erik Berntorp, SWE
11.00 Closing of meeting
11.15 Bus transfer to the ferry
12.45 Ferry departure from Mariehamn (CET+1h)
13.15 Lunch on the ferry
14.15 Arrival to Kapellskäer, transfer to Arlanda airport (90 min)
or Stockholm city (90 min) by bus (CET)





4. "Hereditary Pseudohaemophilia".

FINSKA LÄKARESÄLLSKAPETS HANDLINGAR. BAND LXVII. N:º 2.
(TRANSACTIONS OF THE FINNISH SOCIETY OF MEDICINE.)

ORIGINAL PAPERS

(From the Department of Medicine,
Deaconess Hospital, Helsingfors.
Docent E.A.v. WILLEBRAND)

Hereditary Pseudohaemophilia
by
E. A. v. Willebrand
(With 3 Figures in the Text)

Translated from the original Swedish (1926)

by Peter Wahlberg 1998

ORIGINAL PAPERS

(From the Department of Medicine, Deaconess Hospital,
Helsingfors.

Docent E.A.v. WILLEBRAND)

Hereditary Pseudohaemophilia

by

E. A. v. Willebrand

(With 3 Figures in the Text)

1. Disease Definition. Previously Observed Cases

E. FRANK (Breslau), in his recent big treatise on the haemorrhagic diatheses, puts forward that classical haemophilia is such a purely hereditary-familial anomaly that one has to put in question whether sporadic cases of this disease may exist at all. On the other hand, he says, classical thrombopenia is so exclusively sporadic that it may be put in question whether familial forms of this disease may exist at all. Thrombopenia in this connexion is the disease that since old times carries the name Morbus maculosus WERLHOFFI or Purpura haemorrhagica and which lately by FRANK and some other investigators has been named essential thrombopenia.

To this day, hereditary haemorrhagic disease and haemophilia have been regarded as synonymous. But in studying the relevant literature, one shall find, albeit only in a few cases, descriptions of a familial form of haemorrhagic diathesis which is different from real haemophilia already in the respect that it is seen in women, and, as it seems, even more often than among men. But one may draw a sharp line between this familial disease and haemophilia. More about this in Chapter 6 about diagnosis.

In the word literature, I have encountered 19 such cases, which will be reviewed shortly here:

(Translator's comment: Here follows a review of the individual cases from the literature. These are not translated, only the respective references are given.)

Family I. (KEHRER (Giessen). Archiv für Gynäkologie, 1876. Vol. 10)

Family II-IV. (HAYEM (Paris), Leçons sur les maladies du sang, 1900).

Family V. (AUSTIN AND PEPPER (Philadelphia). The Archives of Internal Medicine, 1913. Vol. XI)

Family VI-IX. (HESS, New York) The Archives of Internal Medicine. 1916, Vol. XVII.

Family X-XVIII. /GLANZMANN (Bern), Jahrbuch für Kinderheilkunde. 1918. Vol. 88.

Fig.1. Glanzmann. Hereditary haemorrhagic thrombasthenia.
 □male non-bleeder ○female non-bleeder
 ■male bleeder ●female bleeder

Family XIX. (KRÖMEKE (Münster i.W.); Deutsche med. Wochenschrift. 1922. N:o 33.)

Such disease cases as those above have earlier been labelled as common haemophilia, even in female patients. - In the literature, more or less sensational reports are now and then found about haemophilia in women. KEHRER also describes his case in a paper with the heading "Die Hämophilie beim weiblichen Geschlechte". As women, however, according to the law of NASSELLOSSEN, never can become haemophiliacs, these cases certainly are due to the present earlier unknown disease. A.F.HESS, who places his cases in the purpura group, states as follows: "The fact is that, although purpura may not be hereditary, and may be idiopathic or due to sepsis of many other causes, there is a definite hereditary purpura". GLANZMANN likewise places the disease in close relationship to morbus WERLHOFFI and considers the latter to be an especially grave manifestation of a hereditary constitutional defect in the thrombocyte system that he labels as "hereditary haemorrhagic thrombasthenia". FRANK objects to this because the familial cases show definite differences from the classical WERLHOFF disease regarding the composition of the blood. Under such circumstances, he finds it difficult to decide whether they should be included into some known group of haemorrhagic diatheses, or if they perchance form a completely new nosological type. In order not to prejudice anything, he for the time being suggests that the familial cases be called hereditary pseudohaemophilia.

2. A Bleeder Family from Åland (Engl. A.)

In April 1924, a girl from Åland with a rather severe haemorrhagic diathesis was admitted at the Department of Medicine of the Deaconess Hospital. It was found that she belonged to a large family within which many members, male as well as female, were bleeders. The disease trait manifested most strongly in the family that from here on will be called the family S. But also the families J. and E. are very interesting, especially with regard to the heredity of the disease (Cnf. the family tree, fig. 2).

Family S.

Mrs. Augusta S., 44 years. Her maternal grandmother bled to death at childbirth. Before this, though, she had happily gone through 6 or 7 deliveries. Mrs. S's mother and 4 of her 10 sisters and brothers had a marked bleeding tendency (See Family J.). Mrs. S herself had had frequent and persistent nose bleeding during her entire youth, but not lately. Had not bled very much from

skin wounds. Menstruation from 16 years, duration 6 days or more, always copious, especially lately. Normal deliveries without stronger bleeding.

Blood examination: (Table on Page 93 of Original)

Mr. Oskar S., 48 years. Farmer. Neither of his parents had been bleeders. Has 3 brothers and 2 sisters. - One sister, Berta E., and several of her children bleed easily (See Family E.). The other siblings are healthy and have healthy children. - 2 female cousins (daughters of Mr. S's maternal aunt) are bleeders. - One of them bleeds strongly from the nose and after dental extractions. Examination of her blood gives normal results with the exception of a fairly marked relative lymphocytosis (61.3%) and low thrombocyte count (55,000). - The other cousin died after profuse bleeding from nose, mouth, intestine and genitalia. She was survived by a son, who so far has been healthy and is now 13 years old. - A female cousin of Mr. S's father (daughter of the father's maternal aunt) had violent nose bleedings as a child. - Himself, Mr. S. has had rather sturdy nose bleedings when he was young, not anymore. Does not bruise more easily than other people.

Mr. and Mrs. S. have had 11 children:

1. Dagny S. Had signs of rickets at birth. At the age of one, she had her first grave nose bleeding after a slight trauma. After this, she had several nose bleedings. Died at the age of 2 from intestinal bleeding.
2. Anna S. Until the age of one she was very strong. Then she began to have frequent nose-bleedings. When she was 4 years old, she fell whereby two teeth penetrated her tongue. She had a bleeding that could not be stopped and died.
3. Thomas S., 15 years. Generally healthy and strong, but often has nose bleeding that however can easily be stopped.
Blood examination: Table on Page 94 of Original.
4. Boy, stillborn.
5. Dagny S. A very feeble and weak child with signs of rickets. When she a few weeks old, she had thrush. When her mother tried to loosen the membranes, there was a bleeding that almost would not stop. Bled much after insect bites. Died at the age of 2 from intestinal bleeding.
6. Harald S., 12 years. Healthy and strong, but often has nose bleedings that are hard to stop
Blood examination: Second Table on Page 94 of Original.
7. Sylvia S., 10 years, well.
Blood examination: Third Table on Page 94 of Original.
8. Runar S., 8 years. Well.
Blood examination: Table on Page 95 of Original.
9. Hjördis S., 5 years. Admitted on 29th April, 1924. Born at term. From birth somewhat feeble. Was nursed for 8 months. Always fidgety and nervous. During the present year she has become stronger, but is still very fidgety. Between age 1 and 2 she had measles. No other diseases of childhood. Walked at the age of one and began to talk at the usual time. She is receptive. At the age of one, her bleeding tendency was observed when she fell and hurt her nose and bled for an unusually long time. At 3 years, she fell and had a deep cut in the upper

lip. Bled heavily for 3 days and became bloodless and almost unconscious. Had to lie in bed for 10 weeks, and then recovered fairly swiftly. After this, she has bled several times, mostly from her nose or gingivae, but she also has had frequent bruising. She once distorted a foot and had a big bleeding into the joint with intense pain for some weeks. Skeleton and musculature normally developed. State of nutrition medium. Skin somewhat pale. On face, arms and legs some bruises of varying size, mostly $\frac{1}{2}$ to 2 cm. in diameter. Looks fairly healthy. No lymph node swelling. Nothing to note from other organs.

Blood Examination: See Second Table on Page 95 of Original.

The erythrocytes are not notably changed in size and form. Neither polychromatophilic nor basophilic punctuation can be discovered. A few normoblasts are seen

Thrombocyte blood picture.: Thrombocytes are seen rather sparsely. Some are normal in appearance, some very pale-coloured, with unclear structure and diffuse borders. Most are small, some are macrothrombocytes. Granules often very unclear, in a few cells pyknotic granules are seen.

Bleeding time very much prolonged. When testing according to DUKE, bleeding continues for 2 hours and has to be stopped by compression. Coagulation test on a watch glass with 20 big drops: Full coagulation after 30 minutes. Swift and good clot retraction on watch-glass. Test-tube test gives no retraction within 3 hours. RUMPEL-LEEDE strongly positive. Needle-prick test according to KOCH weakly positive.

10. Greta S., 3 years. Born at term and was normally developed at birth. Nursed until the age of one. Walked and spoke at normal time. No childhood infections. Was more or less healthy until the age of 1, but from that time on it was observed that she bruised easily. Heavy nose bleeding for the first time at $1\frac{1}{2}$ years, thereafter fairly often. The bleeding often started without any known cause and once went on for a whole week. Even small insect bites had caused bleeding from the skin. Became feeble and weak, and was fidgety. Lately the bleedings have not occurred as often as before. She has also become stronger.

Blood Examination: See First Table on Page 96 of Original.

Thrombocytes are rather numerous in some fields, varying in size, single macrothrombocytes. Some are very pale-coloured with unclear granules.

11. Gerda S., $1\frac{1}{2}$ years. So far no bleeding tendency.

Blood examination: See Second Table on Page 96 of Original.

Family J:

Mr Karl J., 70 years. Farmer. (Father of Mrs. S.). Healthy. Neither his father nor mother seems to have bled. - Blood examination: Thrombocytes 202,400, blood picture also otherwise normal. Bleeding time and clotting time normal.

Mrs. Apollonia J., 62 years. Her father was well and strong until he died from cancer at 70. Mother died from post partum haemorrhage (See Family S.). Mrs. J. herself bruises easily and had lengthy bleeding after giving birth. Has had 11 children:

1. Augusta (Mrs. S., See Family S.)

ANNEX

2. Anna. Died at the age of one from diphtheria. Did not bleed.
3. Apollonia, 37 years. Married. Well. Has 2 healthy sons.
4. Karl, 36 years. At times has had very strong nose bleeding. Has 2 healthy daughters.
5. Gustav, Died at the age of 2 from scarlet fever.
6. Sofia, 32 years. Married. Does not bleed. Has a healthy daughter.
7. Ruben, Died from an accident at the age of 23. Did not bleed.
8. Thyra, 27 years. Unmarried. Earlier had marked tendency to nose bleeding, not anymore. Blood picture, bleeding time and clotting time normal.
9. Nikolaj, 23 years. Bleeds very easily from the nose. The blood examination shows moderate anaemia. Prolonged bleeding time. Normal clotting time.
10. Fanny, 20 years. Unmarried. Bleeds very easily from the nose. Normal blood picture. Normal bleeding time and clotting time.
11. Oskar, 17 years. Does not bleed.

Family E.

Mrs. Berta E., 50 years. (Sister of Mr. S.). As a child she had scarlet fever and then bled copiously from the nose. Also later tendency for nose bleeding.

Blood examination: See Page 97 of Original.

Bleeding time and clotting time normal.

Mr. E., healthy.

6 children:

1. Anna. Well. Has 2 healthy sons.
2. Mathilda. Often nose bleeding. Bleeding time and clotting time normal.
3. Mauritz. Often nose bleeding. Bleeding time not prolonged. Clotting time usual.
4. Ida. Has tendency to bleed.
5. Ester Well.
6. John, 17 years. Nose-bleeder. Slight anaemia. Bleeding time not prolonged.

Fig. 2. Åland bleeder Family. (Page 98).
man not bleeder woman not bleeder man with slight bleeding disease
woman with slight bleeding disease
woman with severe bleeding disease † bled to death

3. Heredity and Mode of Inheritance.

Among those 66 members of the Åland bleeder family which I have had opportunity to examine, there were no less than 23 bleeders. The trait seemed especially frequent among the women; it was observed in 16 of 35 examined women but only in 7 out of 31 men. The inheritance of the disease can be followed through four generations. In the female bleeders, the diathesis becomes manifest both in a milder and in a graver form, whereas the men show only the mild form. Among the female members, five deaths from bleeding have occurred. The bleeder diathesis has mainly been passed

through women. Only in the consanguineous marriage (Family S.), the trait stemmed from both parents.

In some of GLANZMANN's cases, the bleeding trait passes through three generations. Even here, the stronger disposition among women is present. There are no reports of descendants of male bleeders. - If all the persons mentioned by GLANZMANN are counted together, then out of 23 male members 14 are bleeders, out of 26 female members 21 are bleeders.

In the case described by KRÖMEKE, we find in three generations a bleeding tendency that always is passed along by women. Likewise, the female sex here most often has had the haemorrhagic diathesis. Compared with 4 and 5 affected women, respectively, there is only one affected man. Only one of the three sick women in the second generation had passed on the disease, namely to a boy and a girl who both were clearly asthenic and neuropathic.

On the basis of the hereditary circumstances in GLANZMANN's cases, he believes himself to be able to draw the following conclusions:

Both bleeders and non-bleeders can be descendants of a bleeder. On the other hand, it is possible for an individual who not has the haemorrhagic diathesis to pass the trait to the children. GLANZMANN claims that the MENDELian law here is clearly realised. The distribution of the attributes in the relation 1:1 (family I, second generation) is exactly as to be expected according to the MENDELian principles. The bleeder trait is dominant, but the recessive cases without bleeding are not pure, as one would expect according to the MENDELian experiments. A healthy individual should only have descendants who are free from the trait. As in haemophilia, where the daughters of haemophiliacs do not bleed themselves, but have haemophilic children, here too many women may be free from the diathesis in question and still pass it to their descendants. The dominance is however not (as in haemophilia) dependent upon the sex, as both sexes may get the trait in manifest form.

AGNES BLUHM has special objections against this reasoning. She remarks, among other things, that GLANZMANN has not penetrated the heredity question thoroughly enough. He has observed only the affected siblings and relatives, but completely neglected to mention the number of those who are well.

AGNES BLUHM further points out that the trait in hereditary haemorrhagic thrombasthenia with great probability is passed on according to the principle of sex-linked dominant inheritance as described by LENZ. In this type of inheritance, the traits pass from the father to all daughters and from the mother to half of the sons and half of the daughters. Contrarily, traits are never passed from father to son. The dominant sex-linked traits are always manifest. From this follows that diseases of this kind become most common in women. As a rule, twice as many sick women are found as sick men.

In order to have an answer to the question of the heredity type in the Åland bleeder family observed by me, I have consulted our specialist in the science of genetics at the University of Helsingfors, professor FEDERLEY. With the greatest of willingness, professor FEDERLEY has given me all the information that was needed to clarify the question, as well as the following tables.

According to FEDERLEY, my cases, too, are representing a so-called dominant sex-linked inheritance. The trait is bound to the X chromosome, of which men possess one and women two. The trait thus only can be single in the man, wherefore all men are of the same type. The women, however, are of two types, those with a single trait and those with double. The former (heterozygotes) may be less ill, the latter (homozygotes) more. As the men have the single trait, they may also be expected to show the same moderate type¹ as the heterozygous woman.

From the four alternatives in the following diagramme, we are especially interested in Numbers 2 and 3, because these are represented in our family tree. In Family J, the mother is heterozygous and the father free from the trait. Of the six daughters, three are well and three are sick. Of the sons, three are well and two sick. We thus have an ideal correlation with No. 2. The conditions regarding Family E. are rather similar. Here, too, we find a good correlation with No. 2. The consanguineous marriage with 11 children (Family S.) is especially interesting. Here, according to Alternative No. 3, one half of the sons would be well and the other half mildly sick, and one half of the daughters homozygous and the other half heterozygous.

Fig. 3. Dominant sex-linked inheritance.	
normal man	normal woman
slightly sick man	slightly sick woman
sick woman	
X chromosome	X chromosome with sickness trait

For the sons, the resemblance is total. Of the seven girls, five are indicated as very sick (homozygous) and two as well. Here, however, must be pointed out that the two living sick girls perhaps also may be heterozygous. They albeit have had alarming symptoms and signs, but the sickness has in both reached a more moderate stage with only slight bleeding spells. Both the girls indicated as being well could perhaps carry a latent trait which later on perhaps will emerge in a manifest form. Under such circumstances, the correlation to No. 3 would be rather good. It has not been possible to study the heredity among the two other families closely enough. Therefore we cannot compare their relationships with those which are calculated theoretically.

4. Symptoms, Signs and Course of the Disease.

The main, and often the only, clinical sign in our cases is the more or less obvious tendency to bleed. In connexion with heavy bleeding, those persons involved of course show the usual picture of a secondary anaemia. Some patients have been especially feeble and weak and unusually nervous, but in other cases, especially the more moderate, there have been no changes in the general condition. Mrs. S. told that her bleeder children have been lively, more alert and more gifted than those who did not bleed or who bled only slightly.

¹ Within the families described by HAYEM, HESS and GLANZMANN, death from bleeding is also mentioned among male members. Here one must suppose that there were such combinations of traits or such attenuating factors that promoted the grave disease trait.

In many cases, the bleeding starts completely spontaneously or for some completely insignificant reason. Compression, blows and falls are frequently mentioned causes. Small skin wounds may cause prolonged bleeding which is difficult to stop. Some of my patients bled from the skin after insect bites. Ecchymoses and haematomata of the skin occur after slight pushing or even seemingly spontaneously. The most commonly reported form of bleeding is nose bleeding, from which almost all the bleeders in my group have suffered. The patients have been especially prone to bleed from the nose when they did heavy work bending down during the warm season of the year. Nose bleeding, however, has not been dangerous, as bleeding to death from epistaxis has not occurred among my cases. The girl Hjördis S., though, once bled from her nose until she was almost unconscious.

Gingival bleeding is a fairly common manifestation of the haemorrhagic diathesis; it occurs seemingly spontaneously during chewing or during tooth care. Even the physiological dentition may be accompanied by copious loss of blood. Dental extractions are especially dangerous to these patients. Deaths after such operations are known (Cnf. HAYEM's case).

Next are probably genital haemorrhage in women in connexion with the physiological sex functions menstruation and delivery. But bleeding may occur also independently in the form of violent metrorrhagia. GLANZMANN mentions genital bleeding beginning in childhood, as well as the beginning of menstruation at an abnormally early age. Bleeding in the skin is often seen before and after menstruation. In one of my cases, persistent bleeding after delivery was the cause of death. However, menstruation and delivery may also be completely normal, and GLANZMANN claims that physiological bleeding from the genitals is usually not as dangerous as one may think.

Among other inner organs, the urinary system and the intestine may be the bleeding site. Intestinal bleeding was the cause of death in two of my cases, namely in two girls of 2 and 4 years, respectively, belonging to Family S.

Arthriopathy, so common in haemophilia, is comparatively rare in this form of haemorrhagic diathesis. However, haemarthron of the wrist after trauma was seen in one of the Åland patients.

Objective examination of the organs has usually given normal results. Especially one should mention that enlargement of the spleen has not occurred in our cases.

Regarding the time when the disease manifest, GLANZMANN says: (Translator's note: *The following is translated from German.*): "Only little is known about the manifestations in sucklings. Bleeding from the umbilicus is mostly, albeit not without exception, due to anaphylactoid purpura and not to haemorrhagic thrombasthenia. In most cases, the first symptoms do not occur until playing age, in the second or third year of life, when the children have learnt to walk and thus may fall more easily."

It is however quite certain that the bleeding trait in many cases remains latent for a shorter or longer time. One of my cases (Dagny S.) however demonstrates that it may be seen in manifest form already in a suckling, with severe bleeding as early as at an age of some weeks. The same was the case with one of HESS's patients, who almost bled to death after ritual circumcision. - Children who started to bleed at 1 to 3 years were seen both in GLANZMANN's families and in the Åland families. Many of GLANZMANN's patients had their first symptoms at 6-7 years, in other cases not before pu-

berty. At a more mature age, the bleeding tendency may become weaker or even totally disappear, but it may also continue as before during the whole life. Many of the older members of the Åland family tell that they had bled heavily during childhood and youth, but not any more after they grew older. The female ancestor of the family described by KRÖMEKE became sick only in the advanced age of 74 years.

Within the Åland bleeder family, 5 deaths from bleeding are known. They all were female bleeders. The causes of death were:

1. Bleeding to death at delivery
2. Profuse bleeding from mouth, nose, intestine and genitals.
3. and 4. Intestinal bleeding.
5. Cutting wound of the tongue.

5. Blood Findings.

Red corpuscles and haemoglobin concentration. In some of the bleeding patients, there was slight anaemia, mostly of the secondary type with low colour index. One of the family members strangely enough had anaemia with hyperchromatic blood picture (colour index 1.15). - Erythroblasts were seen very sparsely, all were normoblastic of type. Equally seldom, polychromatophilic and basophilic punctuated cells were seen.

The white corpuscles were mostly normal in number. Sometimes, there was slight leukocytosis with at most 12,300 cells. In not so few of the examined, there was a rather considerable lymphocytosis together with neutropenia. In a few number of cases, there was slight eosinophilia.

Thrombocytes. The platelet count in the examined cases varied between 32,200 and 150,000. The lowest values were however not seen in the gravest cases. The girls Hjördis and Greta S., who were those among the living family members who had the gravest diathesis, had platelet counts of 141,000 and 450,000, respectively. It must be added, though, that I did not have opportunity to examine them during a more critical time period. - Examination of the thrombocytic picture showed definite anisocytosis with micro- and macrothrombocytes. Many of the "Plättchen" were irregular of form and had diffuse borders. The dye usually had taken badly and granules were clearly seen.

Summary of the leukocyte formula and thrombocyte number in the examined cases:

Page 105. Table. Name, age bleeder (blödare) or non-bleeder (icke blödare). Leukocyte count. Neutrophils %. Eosinophils %. Lymphocytes %. Platelet count.

The comparatively low thrombocyte counts with the changes in thrombocyte picture speak in favour of a disturbance in the thrombocytogenesis. GLANZMANN wants to relate this disturbance to inferiority in those bone marrow cells, which are regarded to produce thrombocytes, foremost the megakaryocytes. The neutropenia seen in many cases may also be interpreted as a functional disturbance within the leukoblastic system of the bone marrow. I do not want to elaborate on these questions in this connexion.

Bleeding time. Earlier authors have observed that the bleeding time is prolonged proportionally to the diminishing of the thrombo-

cyte count. Bot GLANZMANN and KRÖMEKE have additionally believed themselves to find that the bleeding intensity in itself is increased, although the thrombocyte count and bleeding time are normal.

By testing according to DUKE, we saw that the girl Hjördis S. bled for 2 hours, and that the bleeding even then did not stop until after compression. In the case of Greta S., the bleeding time was considerably prolonged. In contrast to this, many of the other family members had a normal bleeding time.

Clotting time. FRANK, GLANZMANN and KRÖMEKE have mostly found the clotting time to be normal in essential thrombopenia and in hereditary haemorrhagic thrombasthenia. In my cases, too, coagulation time was throughout normal.

Clot retraction. According to FRANK, clot reaction must always be tested with the watch-glass method, because the reagent glass method does not give reliable results. KRÖMEKE is the only one who in the disease now discussed has used the correct method and has observed all the necessary rules. In his Case No. 1, there was total non-retractability of the clot. During the course of disease, when bleeding stopped and the platelet count rose, retractability was better but still remained incomplete. In the other bleeders, the retraction process followed a peculiar route. The seepage of serum began very swiftly, but soon became slow and was incomplete even after 24 hours.

I have studied the clot reaction on a watch glass in only one of my cases (Hjördis S.). This was done at a time when the platelet count was rather high and there was no severe bleeding going on. The reaction was here fairly swift and quire much serum seeped out.

6. Diagnosis and Differential Diagnosis.

To which group of haemorrhagic diatheses should we attribute our cases described here? It was pointed out in the beginning that this disease must be sharply distinguished from classical haemophilia. Our cases were mostly women, whereas manifest haemophilia is seen only in men. We have found significant differences regarding the composition of the blood (See the subsequent table). Finally, the disease is inherited according to different types: In haemophilia the inheritance is sex-linked recessive, in our cases sex-linked dominant. These are some of the more important differences.

The special forms of purpura except the so-called purpura haemorrhagica have been grouped under the heading anaphylactoid purpura, referring to their kinship to anaphylactoid states. Not seldom are infectious found to precede the outbreak of the disease, and thus exogenous causes are the first and foremost operative ones. Even if one wants to suppose that some of the chronic intermittent cases of anaphylactoid purpura have arisen on the basis of a constitutional disposition, it is not known that heredity would play a role as aetiological factor.

Also when the clinical picture is concerned, our cases differ significantly from anaphylactoid purpura. In this disease, we find that the symmetrically arranged cutaneous petecchiae are followed by other phenomena that are completely absent in our cases, namely exanthema, urticaria, oedema, joint affections, abdominal symptoms, albuminuria, haemorrhagic nephritis et cetera. See the subsequent table regarding the blood composition.

Regarding the course of disease, blood picture and mode of inheritance, there is great similarity between our cases and those described by GLANZMANN as "hereditary haemorrhagic thrombasthenia". GLANZMANN seemed to regard the thrombasthenia as a form of Morbus WERLHOFFI. Could perhaps our cases represent a familial form of this disease? The possibility of this may be seen in some other blood diseases that in no case do lack similarities to Morbus WERLHOFFI. I am here referring to pernicious anaemia and haemolytic jaundice. In both these diseases, both sporadic and familial cases are seen.

There are however also cardinal differences, as FRANK has sharply pointed out. - In my cases, the clot retraction on watch glass was fairly normal. But in chronic Morbus WERLHOFFI, this test should always show absent retraction (see the subsequent table). According to FRANK, the platelet count in the chronic form of genuine Morbus WERHOFFI is diminished even during the better periods of the disease and is about 50,000 á 80,000. At the exacerbations, he numbers go down to 30,000 and below. In one of my cases there was an ongoing bleeding in spite of a platelet count of 140,000 and more.

We cannot close our eyes to these differences and under such circumstances we have to reserve our opinion as to the diagnosis. This far it remains uncertain whether this familial disease can be grouped within some known group of haemorrhagic diatheses or, as FRANK supposes, this is a completely new nosological type.

In the following table, the results of the blood examinations are compiled according to the special diagnostic methods for the differentiation of haemorrhagic diatheses.

Method	Haemophilia	Anaphylactoid purpura	Chronic Morbus Werlhofi	My cases
Bleeding time (Duke)	prolonged	normal	prolonged	prolonged
Clotting time	prolonged	normal	normal	normal
Clot retraction (watch-glass)		normal	retarded	normal
Capillary resistance test (RUMPEL-LEEDE)	negative	positive	positive	positive
Needle-prick test (KOCH)	negative	positive	positive	positive
Platelet count	normal	normal	reduced	varying

7. Pathogenesis of the Bleeding.

The importance of the thrombocytes in blood coagulation and haemostasis has for a long time aroused the keen interest of physiologists and haematologists. The fundamental works of HAYEM and BIZZOZERO in the beginning of the 1880:s do unequivocally show that the white thrombus is an aggregate of thrombocytes. Additionally, according to FRANK, "Plättchenthrombus" is the most important factor in haemostasis. The pathogenesis of bleeding is elucidated by FRANK and others who saw a complete parallelism between decrease of thrombocytes and bleeding. About this, FRANK says: (*Translator's comment: Translation from German with preservation of German style*) "If in an individual, the number of thrombocytes sinks below the critical value of 30-35,000 per cubic millimetre - and the general circulatory conditions are not disturbed and the local state of the blood vessel apparatus is unchanged - a rhexis-bleeding (because of blunt or cutting wounds) from capillaries or smallest veins must be intensified in size and duration; if the blood may be regarded as practi-

cally platelet-free (thrombocyte counts of 1,000 to 5,000 per cubic millimetre) one must fear that very severe blood loss, even bleeding to death, may follow. --- The frequent lack of purpura seems to indicate that a general lesion of the vessel walls is not essentially a part of WERLHOF's disease, and that those aetiological factors that are responsible for the lack of thrombocytes generally do not also attack the substance of the capillary tubes".

In order to elucidate his stand-point more closely, FRANK has introduced the concept of "micro-trauma", meaning small lesions during daily life such as rubbing against clothes, stretching of the skin when moving, impaired venous flow during expiration with closed glottis, cough, abdominal pressure, vomiting et cetera. He thinks that such micro-traumata are sufficient causes of bleeding in thrombocytopenia without one having to think of a general lesion of the vessel wall.

LESCHKER claims that FRANK's argumentation does not hold, and believes that micro-traumata do not play any role in WERLHOF's disease. He rather believes that all the phenomena may best be explained by supposing that the same lesion that hits the thrombocyte formation also attacks the capillary endothelia and loosens the seams between them. LESCHKE knows about cases where the thrombocytes are down to 20,000, and even 10,000 or 3,000 when there is no bleeding at all, or bleeding is only occasional with small purpurial patches.

In our patients, the thrombocyte counts were rather varying, but not as low as FRANK's critical values. As described earlier in this paper, these elements showed rather considerable morphological changes. Based on this, one may suppose that there is some inferiority of the thrombocytes, as well as a disturbance of function causing the same effect as in severe thrombocytopenia. In the two bleeder girls, the capillary resistance test was positive. This is however not an absolute sign of an alteration within the capillary walls, although there probably is such an alteration. The pathogenesis of the haemorrhages may in my opinion most easily be explained by a co-operation between these moments, (i.e.) a disturbed function of the thrombocytes and a general lesion of the capillary walls.

Literature (Not translated)

Review in German. (Not translated)

"Los genes definen como
somos pero no quienes
somos. Lo que somos no
cambia con el tiempo.
Quienes somos no deja
de cambiar."

Gil Grissom
CSI Las Vegas

