

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

NADA HUMANO ME ES AJENO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

LICENCIATURA EN PROMOCIÓN DE LA SALUD

La hemostasia y la coagulación en la patología de Von Willebrand

Tesina

TRABAJO RECEPCIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN PROMOCIÓN DE LA SALUD

P R E S E N T A

JOSÉ LUIS VACA DURAN

DIRECTOR

MTRO. DAIRO JESÚS ORJUELA HENRY

Ciudad de México, noviembre de 2025.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

Colegio de Ciencias y Humanidades
Licenciatura en Promoción de la Salud

Título:

“La Hemostasia y la Coagulación en la Patología De Von Willebrand”

Trabajo Recepcional
Para Obtener El Título de
Licenciado en Promoción de la Salud

Presentan:

José Luis Vaca Duran

Director

M. en C. Dairo Jesús Orjuela Henry

Noviembre de 2025

Agradecimiento

Mi sincero agradecimiento a mi alma mater la Universidad Autónoma de la Ciudad de México. Institución que me permitió formarme como un profesionista de la salud, capaz de apoyar a la problemática que se presenta en la ciudad de México, desde un enfoque científico y humanístico

José Luis Vaca Duran, 2025

DEDICATORIA

Mi agradecimiento profundo a mi director de tesis el Mtro. Dairo Jesús Orjuela Henry, y a mis lectores:

Dr. Pablo Claudio Rojas Lara

Dr. José Alberto Mendoza Espinoza

Lic. Silvia Donají Ramírez Raya

Por su incondicional apoyo para realizar el presente trabajo que sienta el precedente de que una persona de la tercera edad puede hacerlo. Entonces todos pueden.

A mis hijos, José Luis Vaca Sánchez (si yo puedo, tú también puedes no desperdicies el don que Dios te dio), Claudia Vaca Sánchez, Norma Vaca Sánchez, que han sido pilares en mi vida para continuar superándome y permitiendo llegar a mis metas finales.

A mis padres que ya fallecieron Carmen Durán López y Ángel Vaca Medina.

Principalmente le dedico esta tesina a mi padre Ángel Vaca Medina quién tenía el deseo de que estudiáramos una carrera, cuales quiera que está fuera “Papá te la dedico, yo sí la logré”. Por último, quiero agradecerle a Dios porque me ha apoyado y permitido lograr mis objetivos y mis metas, amen.

Agradezco a mis hermanos por aceptarme como hermano y que sean parte de una de mis metas en esta vida:

A Rosario, Josefina, Joaquín, Miguel, Eduardo, Lauro, Rosa y David.

Dios bendiga a México y su gente.

Atte. José Luis Vaca Duran

ÍNDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	07
ABSTRACT	07
I INTRODUCCIÓN	08
II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
III METODOLOGÍA	11
IV OBJETIVOS	12
4.1 General	12
4.2 Específicos	12
V MARCO TEÓRICO	13
5.1 Conceptos Generales	13
5.1.1. Hemostasia	13
5.1.2. Producción de células sanguíneas	14
5.1.3 Procesos bioquímicos más relevantes vinculados con la síntesis plaquetaria	18
5.1.3.1 Megacariopoyesis	18
5.1.3.2 Endomitosis	19
5.1.3.3 Megacariocitos poliploides	22
5.1.3.4 Maduración del citoplasma de los megacariocitos	23
5.1.3.5. Trombopoyesis	27
5.2 ¿Qué Funciones Cumplen los megacariocitos?	30
5.2.1. Producción de plaquetas	30
5.2.2. Los megacariocitos colaboran en la conservación del tejido óseo	31
5.2.3. Los megacariocitos controlan la multiplicación y la inactividad de las CTH	32
5.2.4. Los megacariocitos juegan un papel importante en el	33

mantenimiento de la matriz extracelular y participan en el desarrollo de la mielofibrosis

5.3. Señales de Activación de los Factores que Intervienen para la Formación del Coágulo 35

5.3.1 Hemostasia primaria 36

5.3.1 Hemostasia secundaria 38

5.4 Fibrinólisis y Anticoagulación 41

5.4.1 Bioquímica del sistema de la fibrinólisis. 42

5.4.1.1 Plasminógeno 44

5.4.1.2 Activador tisular del plasminógeno 44

5.4.1.3 Urocinasa 45

5.4.1.4 Receptor del activador del plasminógeno tipo 45

urocinasa

5.4.1.5 Alfa-2-antiplasmina 46

5.4.1.6 Inhibidor del activador tisular del plasminógeno 46

5.4.1.7 Inhibición de la plasmina por α_2 -antiplasmina 48

5.4.2 Papel regulatorio del activador tisular del plasminógeno. 48

5.4.3 Bioquímica de acción de la urocinasa 50

5.4.4 Liberación y Síntesis de los activadores del plasminógeno 51

5.4.5 Liberación y Síntesis de los inhibidores de los activadores 52

del plasminógeno

5.5 Factores de riesgo Trombótico 53

5.5.1 Deficiencia de antitrombina 54

5.5.2 Deficiencia de proteína C 55

5.5.3 Deficiencia de proteína S 55

5.5.4 Resistencia a la proteína C activada y factor V de Leiden 55

5.5.5 Mutación G20210A del gen de la protrombina 56

5.5.6 Hiperhomocisteinemia 57

5.5.7 Anticuerpos antifosfolipídicos 57

5.5.8 Anomalías congénitas del fibrinógeno 58

5.6 Indicadores del estudio de hipercoagulabilidad 58

	5.6.1 Valores altos de factor VIII	58
	5.6.2 Valores altos de factor XI	59
	5.6.3 Indicaciones del estudio de hipercoagulabilidad	59
VI	JUSTIFICACIÓN	61
VI	RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA	62
	6.1 Clasificación de la Enfermedad	62
	6.2 Epidemiología de la Enfermedad de von Willenbrand	64
	6.3 Características Clínicas	67
	6.4 Mutaciones Asociadas a la Enfermedad	70
	6.4.1 Generalidades	70
	6.4.2 Descripción del Gen VWF	70
	6.4.3 Descripción de la estructura genética de VWF	71
	6.4.4 Datos e historia del mapeo del gen	72
	6.4.5 Características bioquímicas Estructura cristalina	75
	6.4.5.1 Unión del FVIII a la región D'D3.	77
	6.4.5.2 Unión ADAMTS13 al dominio A2	83
	6.4.5.3 Unión de $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ al dominio C4	87
VII	CONCLUSIONES	90
	REFERENCIAS	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Hematopoyesis Humana	14
Figura 2	Regulación de la Producción Plaquetaria	17
Figura 3	Trozo de bazo de ratón captado por microfotografía	19
Figura 4	Diagrama de la Trombopoyesis	29
Figura 5.	Resumen de las principales funciones del megacariocito	34
Figura 6	Etapas de la cascada de señalización plaquetaria posterior al daño en los vasos sanguíneos	37
Figura 7	Bioquímica de la coagulación	40
Figura 8	Bioquímica de la fibrinólisis	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Resumen de los tipos de gránulos del megacariocito	26
Tabla 2	Características químicas y genéticas de los componentes de la fibrosis	43
Tabla 3.	Prevalencia estimada de factores protombóticos	54

RESUMEN

El propósito principal de este trabajo es exponer la etiología de la enfermedad de Von Willebrand, sus rasgos genéticos y contribuir al diagnóstico clínico. Para ello, se presentan los fundamentos del proceso de coagulación y los principios homeostáticos que regulan la formación de plaquetas. Finalmente, se describen las investigaciones más relevantes relacionadas con la genética y la clínica de esta enfermedad. Este trabajo, presentado desde una perspectiva descriptiva, busca ser una recopilación sistemática de una enfermedad que es poco descrita en los manuales médicos pero que tiene un gran valor.

ABSTRACT

This paper summarizes some of the studies related to von Willebrand disease, with the primary objective of describing its etiology, genetic characteristics, and contribution to clinical diagnosis. To this end, the fundamentals of the coagulation process and the homeostatic principles governing platelet formation are discussed, and finally, the main studies related to the genetics and clinical aspects of the disease are described. From a descriptive perspective, this paper appears to be an organized review of a highly important disease, one that is scarcely described in medical textbooks.

I INTRODUCCIÓN

Tomada de González-Villalva A, Bizarro-Nevarés P, Rojas-Lemus M, López-Valdez N, Ustarroz-Cano M, Barbosa-Barrón F, García-Gil B, Albarrán-Alonso JC, Fortoul van der Goes TI. El megacariocito: una célula muy original. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 2019, 62(1), 6-18.

Desde tiempos antiguos, la sangre ha sido considerada vital para vivir. La curiosidad por entender cómo se origina la sangre, cuáles son sus componentes y qué beneficios aporta a la vida fue un interrogante que mantuvo despierta la curiosidad de los investigadores durante siglos.

La exploración del conocimiento a lo largo de distintas épocas brindó una variedad de hallazgos que, al sumarse, han hecho posible comprender la homeostasis fisiológica de este vital líquido, considerado esencial desde los inicios de nuestros tiempos. Acorde a la medicina antigua, la sangre era uno de los cuatro humores básicos que componen la materia viva. Sin embargo, a partir del siglo XVII, se convirtió en una combinación de fluidos y partículas variadas, que el corazón mueve sin cesar. Cuando entendieron el componente iatromecánico de la circulación sanguínea, los científicos se enfocaron en analizar la composición de la sangre. Para ello, utilizaron las herramientas científicas contemporáneas a la época del Barroco, como por ejemplo los colorantes, los reactivos químicos, los dispositivos de cuantificación y los microscopios.

En el siglo XVII, se encontró que la sangre era metálica debido a la presencia de partículas de hierro en ella y se descubrieron los eritrocitos. Los leucocitos fueron incorporados en el siglo XVIII, seguidos de las plaquetas casi un siglo más tarde. La coagulación de la sangre, uno de los enigmas más grandes por resolver, comenzó a ser esclarecido desde el siglo XVII con el hallazgo de la fibrina en la estructura de los coágulos. En el siglo XIX se descubrieron las plaquetas, la trombina y el factor tisular. A comienzos del siglo XX, se conocía la morfología y el origen de las células

sanguíneas, además de los cambios que estas experimentan en ciertas enfermedades. Asimismo, se habían establecido los fundamentos de la clínica hematológica, del laboratorio clínico y de algunos tratamientos terapéuticos como la transfusión sanguínea. La identificación de los componentes del plasma, el hallazgo de las leyes hereditarias, la invención de técnicas para identificar células y la habilidad para crear instrumentos de análisis cada vez más exactos han producido una multitud de especialidades científicas que se ocupan de la sangre. Entre ellas están: Hematología, Inmunología, Bioquímica Clínica, Patología Clínica, Hemostasiología, Medicina Transfusional y Hematogenética (González-Villalva et al 2019).

II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La patología de Von Willebrand es uno de los problemas de salud que es causa de más complicaciones en el momento de su diagnóstico, el cual, es necesario para realizar el tratamiento adecuado y ayudar en la recuperación de la salud del paciente que padezca este tipo de enfermedad. Siendo un trastorno hemorrágico que se caracteriza por la falta o disfunción del factor de Von Willebrand (VW), en una proteína que juega un papel crucial en la coagulación de la sangre.

Uno de los errores que ocupan al laboratorio de diagnóstico de esta patología es que es recomendable aplicar un frotis de sangre fresca del paciente para estar seguros del recuento de las plaquetas. Pues en algunos casos falla el diagnóstico por la tecnología moderna en donde las máquinas automáticas, no cuentan las plaquetas que llegaran a quedar detrás de otros elementos de la sangre y no contabilizarlos. Lo cual es común, entonces se recomienda hacer el recuento de plaquetas *in vivo* y no *in vitro*. Por tal motivo se sugiere este procedimiento se realice con un frotis de sangre; del cual ya se ha comprobado su buen funcionamiento.

Al contrario de los riesgos que conlleva esta enfermedad existen pocos estudios compilatorios acerca de su bioquímica y patología, por lo cual este trabajo presente reunir algunos de los conceptos y estudios genéticos que se tienen de esta patología

III METODOLOGÍA

Este tratado está basado en una revisión de la literatura científica que aborda la temática de las enfermedades de **VON WILLEBRAND**. Así como investigaciones actuales publicadas en revistas científicas médicas, se empleó como base principal de búsqueda, the National Library of Medicine así como las bases de revistas latinoamericanas como Scopus, tomando como indicador de búsqueda “**VON WILLEBRAND.**” .

Es importante mencionar que se tomaron en cuenta estudios realizados por diferentes instituciones nacionales e internacionales que efectúan investigaciones en el campo de la salud y se consideraron las que incluyen la patología de Von Willebrand. Entre ellas las investigaciones contemporáneas recientes del Instituto de Hematopatología de Querétaro

IV OBJETIVO

4.1 General

Realizar una revisión bibliográfica de los estudios más recientes sobre el factor de Von Willenbrand y su participación en la coagulación sanguínea, apoyándonos en las principales investigaciones que sentaron las bases genéticas de la enfermedad.

4.2 Específicos

- Descripción de los conceptos generales del proceso de coagulación
- Descripción de los principales procesos bioquímicos
- Descripción de la enfermedad de Von Willebrand

V. MARCO TEÓRICO

5.1 Conceptos Generales

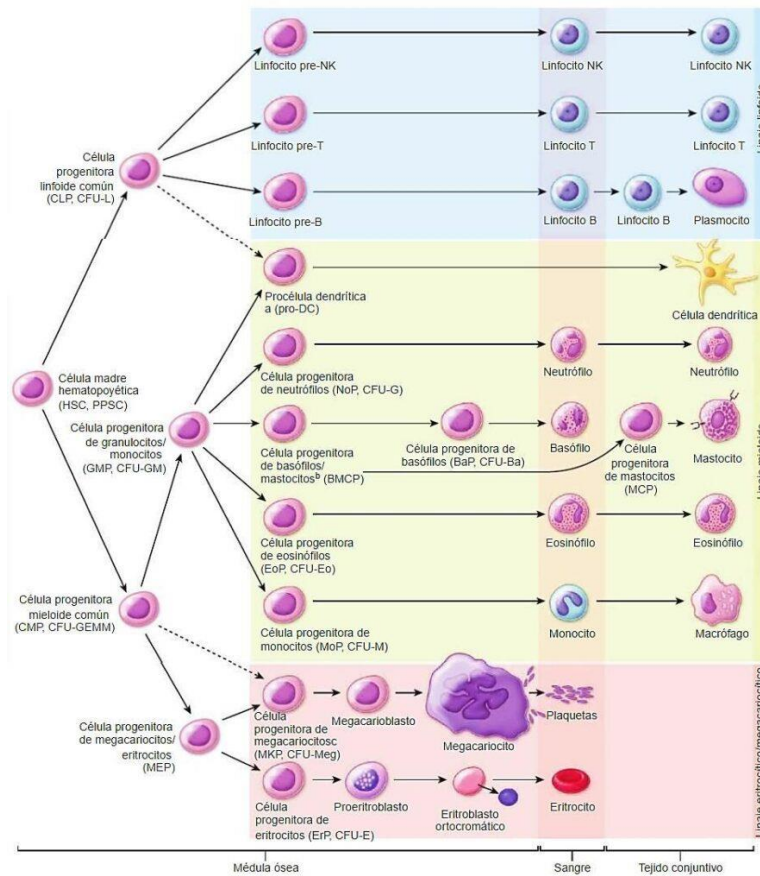
5.1.1. Hemostasia. Proceso donde se incluyen varios mecanismos que permiten que la sangre tenga un estado adecuado para fluir en los vasos sanguíneos, uno de los objetivos es cómo detener las hemorragias en caso de una ruptura vascular. La hemostasia se clasifica en tres etapas que están relacionadas entre sí, las cuales se describen a continuación:

1. Hemostasia primaria: La hemostasia primaria es la etapa inicial que restringe el sangrado a una brecha vascular, lo que lleva a la agregación plaquetaria y la creación de un taponamiento hemostático. A menudo, este tapón tiene que formarse a través de una red de fibrina durante la coagulación del plasma. Este proceso implica una serie de pasos en los que se activan factores (proteínas) relacionados con la coagulación y que finalmente llevan a convertir el fibrinógeno del plasma en una red sólida y estable de fibrina (Vayne *et al.*, 2021).
2. Coagulación: Que se basa en una serie de factores (proteínas) de la coagulación que van activándose y que, al final, convierten el fibrinógeno en una red sólida y estable de fibrina. Estos factores se unen a los extremos de la fibrina a través de un enlace covalente (Vayne *et al.*, 2021).
3. Fibrinólisis: Después de la recuperación de las células endoteliales que recubren el lugar donde hubo la lesión del endotelio, así se liberan sustancias que disuelven las plaquetas y la fibrina y queda una cicatriz que sella el lugar de la lesión vascular. De lo anterior retomaremos las plaquetas por la función tan importante que realizan en este fenómeno de coagulación (Espinosa y Reverter, 2023)

5.1.2. Producción de células sanguíneas

Tomado de González-Villalva A, Bizarro-Neves P, Rojas-Lemus M, López-Valdez N, Ustarroz-Cano M, Barbosa-Barrón F, García-Gil B, Albarrán-Alonso JC, Fortoul van der Goes TI. El megacariocito: una célula muy original. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 2019, 62(1), 6-18.

Las células sanguíneas se sintetizan en la médula ósea, dicha estructura esponjosa se encuentra en el centro de los huesos, sin embargo, su regulación es más compleja y participan otros sistemas bioquímicos como se observan en la Figura 1



Fuente: Tomado de <https://esquemasde.com/wp-content/uploads/esquema-de-hematopoyesis-la-creacion-de-la-sangre-en-nuestro-cuerpo.jpg>

Figura 1. Hematopoyesis humana

Las plaquetas se generan durante el procedimiento de creación de células sanguíneas conocido como trombopoyesis en la médula ósea, mediante la fragmentación en las fronteras citoplasmáticas de los megacariocitos. "Los megacariocitos son células de diámetro variable que oscilan entre 50 y 150µm, poseen un único núcleo poliploide y multilobulado que puede alcanzar 64n. Se considera que cada lóbulo del núcleo posee 2n, de ahí su nombre, derivado de la palabra latina mega 'grande' y 'núcleo'. Poseen un proceso de crecimiento único conocido como endomitosis, que implica que la célula duplica su material genético y comienza el proceso de mitosis, pero sin citocinesis ni cariocinesis; de esta manera, si esta célula no se divide en dos células descendientes, se expande, acumulando más citoplasma y con un núcleo lobulado que crece progresivamente. A medida que las células se desarrollan, su citoplasma también se madura, lo que significa que se generan grandes cantidades de proteínas que se guardan en sus tres tipos de gránulos, que serán los que transmitirán la herencia a las plaquetas: alfa o A, delta o densos y lambda o los lisosomas. Finalmente, se producirá el proceso de descomposición del citoplasma para generar las plaquetas, y el núcleo vacío de los megacariocitos será fagocitado por los macrófagos de la médula osificada. También se ha documentado la presencia de megacariocitos productores de plaquetas en el pulmón."

Antes de poco más de cien años, las plaquetas eran vistas como "el polvo de la sangre". Luego, Adisson, Osler y Hayem las describieron. En 1882, Bizzozero las denominaba plaquetas y describió su capacidad de adhesión, siendo también el primero en describir a los megacariocitos. No obstante, Howell les otorgó su nombre actual en 1890. James Homer Wright, empleando la tinción que lleva su nombre, reconoció a los Megacariocitos como los antecesores de las plaquetas.

Inicialmente, la biología de esta célula resultó complicada, principalmente debido a los retos de llevar a cabo cultivos y examinar sus funciones. Sin embargo, desde el hallazgo del receptor de trombopoyetina, conocido como Mpl, en 1992, y luego del hallazgo de la trombopoyetina (TPO) en 1994, realizado por varios

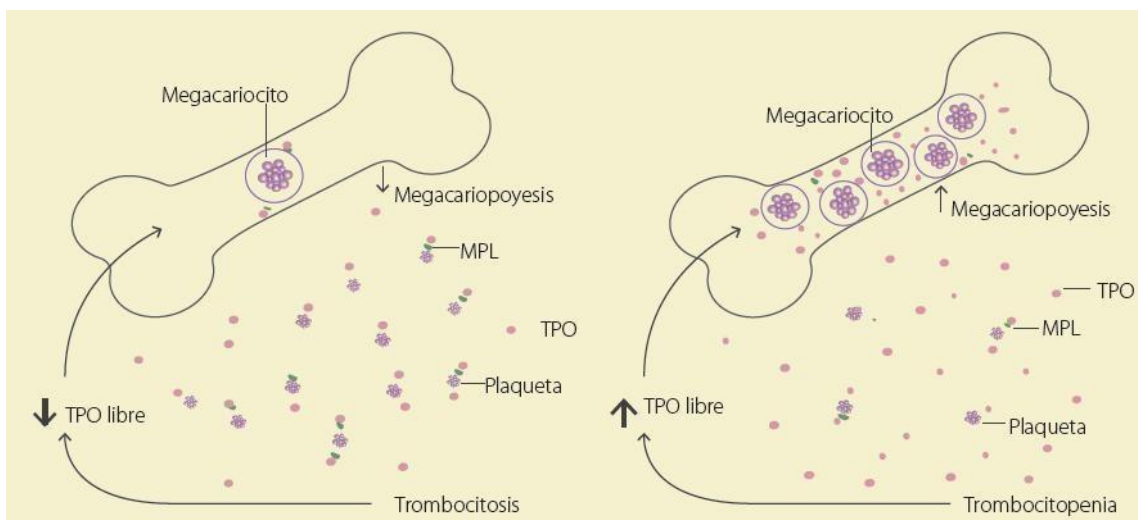
grupos al mismo tiempo, se ha logrado un gran progreso en el conocimiento de la biología de los megacariocitos.

La hormona que regula la producción de plaquetas es la TPO, que además estimula de manera efectiva a las células responsables de formar colonias de megacariocitos y promueve el crecimiento y la supervivencia de las células troncales hematopoyéticas (CTH). En efecto, su receptor Mpl se encuentra desde las células madre hematopoyéticas hasta las células sanguíneas.

La TPO se produce sobre todo en el hígado, pero en menor cantidad en la médula ósea y los riñones. Su producción es constitutiva y, en relación con la cuenta plaquetaria, los niveles de TPO libre en sangre y médula ósea se encuentran en proporción inversa. La unión de los niveles de TPO a su receptor Mpl, así como su internalización y destrucción, son los principales factores en la regulación de estos. Así pues, si hay un gran número de plaquetas, se une una gran cantidad de TPO a su receptor Mpl y hay poca TPO libre que mejore la maduración de megacariocitos. Sucede lo opuesto si hay escasez de plaquetas: se reducen los lugares donde la TPO puede unirse a su receptor y hay más TPO libre para estimular la megacariopoyesis (ver Figura 2).

Cuando TPO se une a su receptor Mpl, JAK2 se activa. Luego, este fosforila y activa a STAT3 y STAT5, que estimulan el crecimiento celular. Los caminos de MAPK se activan también, lo que favorece la maduración de los megacariocitos. La TPO promueve la endomitosis, la maduración y una amplia gama de efectos antiapoptóticos en los precursores megacariocíticos y en los megacariocitos. El receptor de trombopoyetina Mpl se encuentra en una extensa gama de células hematopoyéticas, incluyendo todas las del linaje megacariocítico. Sin embargo, también está presente en otros tipos de células, como los miocardiocitos, astrocitos, neuronas y células microgliales. Aún queda por investigar el impacto que tiene este receptor en estas otras células que no pertenecen al sistema

hematopoyético. Con el fin de entender mejor estos procesos, ofreceremos algunas cualidades de los procesos bioquímicos que ocurren en la médula, basándonos en el esquema presentado en la Figura 2.



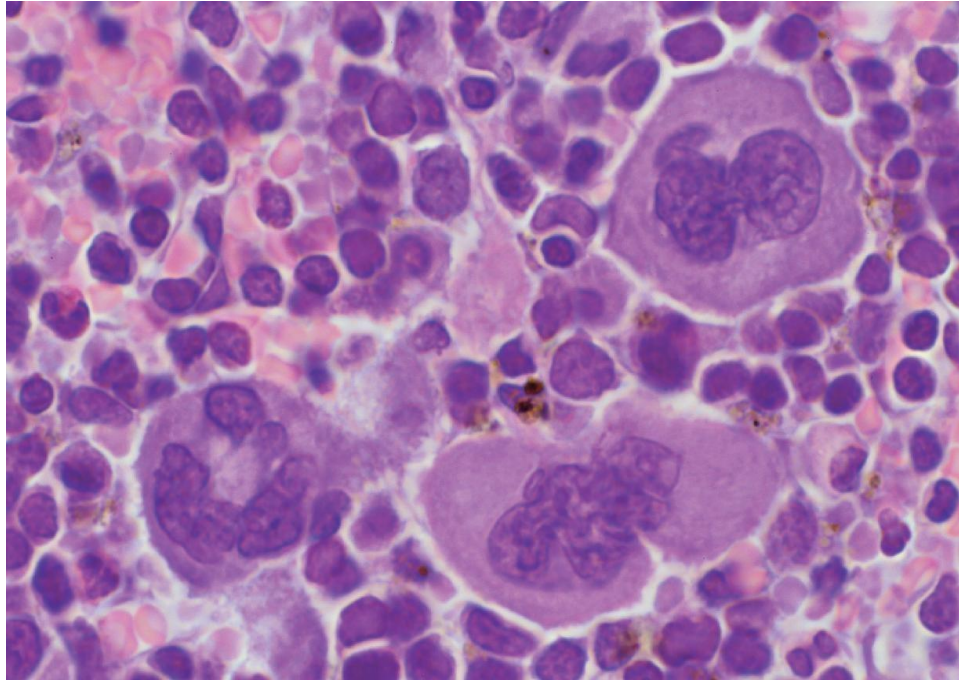
Fuente: Tomada de
https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422019000100006

Figura 2. Regulación de la Producción Plaquetaria

5.1.3 Procesos bioquímicos más relevantes vinculados con la síntesis plaquetaria

5.1.3.1 Megacariopoyesis. Es un proceso que se lleva a cabo en 5 a 7 días, en el que tiene lugar la proliferación y diferenciación desde la CTH hasta llegar al megacariocito maduro. La megacariopoyesis se lleva a cabo en la médula ósea roja, aunque también se ha documentado que tiene lugar de manera significativa en el pulmón. Para entender este procedimiento de forma simple, se puede dividir en dos etapas: la fase proliferativa, que consiste en la expansión de los precursores megacariocíticos, y la fase madurativa, que incluye los dos eventos más importantes de esta línea. El primero es la poliploidización por endomitosis, a escala nuclear; y el segundo, la maduración del citoplasma.

varias células de la línea megacariocítica son identificables: el megacarioblasto tiene un diámetro de alrededor de 10 μm y presenta un núcleo bilobulado; el promegacariocito, con un diámetro que oscila entre 10 y 50 μm , cuenta con un núcleo arriñonado (su ploidía es de 4 a 8N); por último, el megacariocito mide entre 50 y 150 μm de diámetro y su núcleo es multilobulado (esta etapa de maduración es la más común y fácil de reconocer) (Figuras 3).



Fuente: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422019000100006

Figura 3. Trozo de bazo de ratón captado por microfotografía

Cuando la poliploidización se para, los megacariocitos han aumentado significativamente su masa citoplasmática, el número de organelos y la creación de gránulos específicos, además de haber creado el sistema de demarcación de membrana. Finalmente, reestructuran el citoesqueleto para crear pseudópodos largos conocidos como proplaquetas. Estos se dividen y dan lugar a las plaquetas.

5.1.3.2 Endomitosis: El megacariocito tiene que crecer mucho porque cuanto más grande es, puede producir más plaquetas. A fin de incrementar la masa, en la diferenciación megacariocítica tardía se pasa de una mitosis clásica a un proceso endomitótico, el cual genera una célula gigante. La endomitosis es el proceso mediante el cual estas células se vuelven poliploides y grandes; se caracteriza como un proceso mitótico "inconcluso" o "abortado". El núcleo multilobulado del

megacariocito, que se explica a continuación, es el producto de la poliploidización por medio del proceso endomitótico.

Los megacariocitos maduros son poliploides, con un número de copias de los cromosomas que puede ser 4, 8, 16, 32 o 64N; lo más habitual es que sean de tipo 16N. Cuando la demanda de plaquetas es más alta, el nivel de ploidía puede incrementarse (puede llegar hasta 128N). La poliploidización es un proceso necesario para su maduración final. No obstante, se encuentran los micro-megacariocitos (2N y 4N), que son células maduras; esto ocurre en el hígado fetal y en ciertas enfermedades.

La poliploidización, que es el incremento en la cantidad de cromosomas en cualquier célula, se produce a través de múltiples ciclos consecutivos de replicación del ADN. Esto puede ocurrir por medio de dos mecanismos distintos: la endomitosis o la endorreplicación con endociclos (que tiene lugar en los trofoblastos, las plantas y la mosca de la fruta –*Drosophila*–). La diferencia entre los dos es que uno entra a la mitosis y el otro no. Los estudios verifican la incorporación de los megacariocitos al proceso mitótico.

El proceso de megacariopoyesis comienza con los megacarioblastos. Estos experimentan mitosis y generan un complejo mitótico multipolar (dos polos si es 2N, cuatro polos si es 4N, etc.), durante el cual los cromosomas se segregan de manera asimétrica hacia diversos polos. Sin embargo, esto no tiene consecuencias funcionales porque solo se origina un núcleo multilobulado.

El proceso de megacariopoyesis comienza con los megacarioblastos. Estos experimentan mitosis y generan un complejo mitótico multipolar (dos polos si es 2N, cuatro polos si es 4N, etc.), durante el cual los cromosomas se segregan de manera asimétrica hacia diversos polos. Sin embargo, esto no tiene

consecuencias funcionales porque solo se origina un núcleo multilobulado. Las dos células hijas parecen separarse, con una zona media normal y el surco de escisión que se genera; sin embargo, este último retrocede rápidamente y las dos células hijas se unen. Un suceso parecido se presenta en el cambio de 4N a 8N, cuando la ploidía se incrementa y, en estas células, la morfología recuerda a los "pétalos de una rosa". Lo dicho anteriormente señala que las irregularidades en la formación del surco son significativas para comprender el proceso endomitótico.

El proceso endomitótico es más complicado que una simple citocinesis defectuosa. A la larga, la citocinesis defectuosa da lugar a células multinucleadas. Sin embargo, en el proceso de maduración de los MKs, la cariocinesis también es anormal. El núcleo se vuelve multilobulado porque entre los núcleos de las células hijas persisten puentes nucleoplásmicos; estos puentes hacen que los núcleos no se separen del todo. Cuando las células hijas se unen, lo hacen también sus núcleos y así surge una célula 4N con un único núcleo bilobulado (es decir, un megacarioblasto). A medida que la diferenciación progresa, este proceso se repite y se añaden lóbulos al núcleo.

La mitosis es un proceso que se regula de manera rigurosa en todos los tipos celulares para prevenir la formación de células anormales. No obstante, durante la megacariopoyesis, ocurren modificaciones significativas en este proceso, que dan como resultado células poliploides. Los megacariocitos se poliploidizan como consecuencia de la endomitosis, que a su vez es el producto de una mitosis incompleta (sin cariocinesis y sin citocinesis). La disparidad tan notoria que existe entre la mitosis y la endomitosis se debe a las proteínas que están presentes, ausentes o en un número determinado, así como a los factores de crecimiento que responden y a los factores de transcripción que expresan.

5.1.3.3 Megacariocitos con poliploidia. La división celular no es tan eficaz como la poliploidización para aumentar el número de plaquetas. Los megacariocitos maduros con $2N$ pueden producir entre una y dos plaquetas, en cambio un megacariocito con $16N$ generará alrededor de 2,000 plaquetas. Esto implica que 3 etapas de replicación del ADN resultarán en la producción de 16 plaquetas por el camino mitótico (2,000 por el endomitótico). De esta manera, se hace evidente cuán importante es la poliploidia en la diferenciación megacariocítica.

En el ser humano, los primeros megacariocitos son diploides a lo largo de la vida intrauterina. Así, aunque no es estrictamente necesario poliploidear estas células, es una manera muy eficaz de aumentar la eficiencia de la producción plaquetaria.

El megacariocito es exclusivo de los mamíferos; su genoma se duplica totalmente en cada ciclo de poliploidización, pero no se encuentra en otras especies. En este genoma, los alelos mantienen una distribución de heterocromatina. Por ejemplo, en los $16N$, todos los 32 alelos están activos, a excepción de aquellos que se encuentran en el cromosoma X de las hembras.

Esto significa que la célula tiene un metabolismo activo y eficiente, lo que le permite aumentar la producción de proteínas y ser más eficaz en soportar el estrés metabólico y genotóxico, así como también a la haploinsuficiencia.

La poliploidización se ve afectada por diversos elementos y, sin duda, el de mayor crecimiento es la TPO, dado que influye en las CTH y en todo el proceso de diferenciación megacariocítica. TPO, junto con otros elementos del crecimiento, controla el ciclo mitótico y endomitótico durante la transición G1/S. La TPO regula la poliploidización extracelular, pero no la creación de proplaquetas. La célula posee además una regulación autónoma, la cual está controlada por numerosos factores de transcripción.

La trombocitopenia es el resultado de las fallas en la poliploidización, las cuales generan dificultades en el crecimiento de los megacariocitos. En cambio, la trombocitosis muestra una poliploidia elevada.

5.1.3.4 El proceso de maduración del citoplasma en los megacariocitos. En el curso de la maduración, el citoplasma de los megacariocitos se especializa significativamente. Un rasgo notable de este proceso es que aparecen gradualmente diferentes tipos de gránulos, como los gránulos densos y los alfa, así como lisosomas. Estos componentes pueden ser detectados en pequeñas proporciones desde etapas muy tempranas, como las células precursoras de megacariocitos, y su cantidad se incrementa a medida que avanza la maduración.

Se sabe que la composición de los lisosomas es bastante más heterogénea en comparación con la de los gránulos densos y los gránulos alfa, además de que estos últimos se generan después de aquellos. Se generan por medio de la vía RER-Golgi-endosomas y albergan enzimas hidrolíticas como lipasas, proteasas y glucosidasas, que participan en la descomposición de lípidos, carbohidratos y proteínas respectivamente.

Los lisosomas de los megacariocitos tienen también aril sulfatasa, fosfatasa ácida y catepsinas D y E. Además de estas proteínas, tienen proteínas ubicuas de las membranas lisosomales como LAMP-1, LAMP-2 y LAMP-3 (CD63). Los gránulos alfa y densos de los megacariocitos, por otro lado, son muy especializados y forman parte de la familia de organelos "conectados con los lisosomas.

A diferencia de los gránulos secretores típicos, estos se desarrollan a partir de vesículas diminutas que se generan en el complejo de Golgi. Desde ahí, se transforman en cuerpos multivesiculares que interactúan con vesículas endocíticas

para dar lugar a los gránulos densos y alfa maduros.

Los gránulos alfa tienen una densidad y un tamaño homogéneos, a diferencia de los densos, que presentan un fondo granular claro circunscrito por la membrana plasmática, la cual encierra un núcleo más denso que puede estar en el centro o fuera del eje central.

Los gránulos alfa son los más prevalentes y tienen factores esenciales para la angiogénesis, la inflamación, la adhesión plaquetaria, el crecimiento de tejidos para sanar heridas y la reorganización del tejido óseo.

Son esféricos, con una densidad uniforme y un centro ligeramente denso. Los gránulos alfa de los megacariocitos pueden contener proteínas de diversas categorías.

La primera clase comprende aquellas proteínas sintetizadas específicamente por los megacariocitos, como la tromboglobulina y el factor de plaquetas tipo 4 (PF4); la segunda incluye proteínas producidas por el megacariocito, aunque no de forma específica. Entre ellas se encuentran el factor de coagulación tipo V, la trombospondina, la P-selectina y el factor de von Willebrand (VWF).

A medida que la maduración megacariocítica progresa, se eleva la expresión de todos estos factores y se sitúan en los gránulos alfa futuros. Finalmente, otras proteínas como la albúmina, el fibrinógeno y la inmunoglobulina G son producidas por células diferentes a los megacariocitos y posteriormente son endocitadas por estos últimos, al unirse a glucoproteínas de la membrana plasmática, como las GPIIb o IIIa. Algunos gránulos alfa también contienen exosomas (de 40 a 100 nm) que poseen la proteína CD63, una proteína lisosomal que se libera en respuesta a la

activación de trombina.

Los gránulos densos, que incluyen sustancias como la serotonina, catecolaminas, adenosin 5-difosfato (ADP), adenosin 5-trifosfato (ATP), calcio y polifosfatos, contienen diversos factores de importancia hemostática. Se destacan por su papel en la activación y atracción de plaquetas hacia las zonas donde hay daño vascular.

Los gránulos densos, además de estos elementos, incluyen componentes integrales de la membrana, como granulofisina (un marcador específico de los gránulos densos), glucoproteína Ib (GPIB), P-selectina y glucoproteína IIb. La Tabla 1 sintetiza los componentes más importantes de los gránulos de los megacariocitos y la función que cumple cada uno.

Tabla 1. Esquema del tipo de gránulos del megacariocito

Tipo de gránulo	Contenido de los gránulos
1. Gránulos alfa	
	Factor plaquetario
	Trombospondia 1 y 2
	β Tromboglobulina
	Factor de Von Willebrand
	PDGF (Factor de creciente derivado de plaquetas)
	TGF beta (Factor de crecimiento transformante β)
	EGF (Factor de crecimiento epidérmico)
	VEGF (Factor de crecimiento endotelial vascular)
2. Gránulos densos o delta	
	Adenosin trifosfato, adenosin difosfato
	Serotonina, histamina, adrenalina
	Calcio, magnesio
3. Gránulos lambda o lisosomas	
	Hidrolasas acidas; fosfatasas ácidas, proteasas, glucosidasas, lipasas, nucleasas

Tomada y adaptada de:

https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422019000100006

5.1.3.5 Trombopoyesis. La trombopoyesis es el proceso por el que se generan las plaquetas, e involucra los últimos sucesos de la maduración de los megacariocitos. Estos comienzan a crear proplaquetas y liberan las plaquetas directamente al flujo sanguíneo.

La trombopoyesis se lleva a cabo en el nicho vascular de la médula ósea después de que los megacariocitos maduran y ocurre la megacariopoyesis. En otras palabras, el megacariocito se desplaza hasta las sinusoides, donde el microambiente favorece la creación de plaquetas.

Las células mesenquimatosas y las reticulares que se encuentran en la médula ósea participan en la reestructuración del citoesqueleto y en la generación de factores quimiotácticos que hacen que los megacariocitos sean atraídos a los capilares sinusoidales. Los factores de crecimiento que participan en la producción de plaquetas incluyen el factor inhibidor de leucemia, los SCF (factores de células madre), IL3, IL6 y IL11. En los nichos donde están presentes los megacariocitos, la fibrina, el colágeno IV y la laminina son predominantes. Estos elementos colaboran en sostener y guiar las proplaquetas hacia las sinusoides. Las células reticulares generan SDF-1, (factor 1 derivado de células estromales), conocido también como CXCL-12; el receptor correspondiente a esta quimiocina es el CXCR-4. La señal de que los megacariocitos se desplacen hacia las sinusoides es la interacción entre SDF-1 y CXCR-4.

Cuando los megacariocitos se acercan a las sinusoides, se unen a las células del endotelio. Se ha observado que el FGF-4 (factor de crecimiento de fibroblastos 4) interviene en este proceso porque estimula la producción de VCAM-1 (molécula de adhesión celular vascular 1) en las células del endotelio de las sinusoides.

El megacariocito presenta cambios físicos que hacen que se extienda el citoplasma, generando prolongaciones de entre 2 y 4 μm de diámetro. El transporte de organelos y gránulos hacia las proplaquetas, así como la formación de estas prolongaciones, está condicionado por los microtúbulos. Cuando las proplaquetas se han desarrollado en las sinusoides y luego se dividen, liberan al final plaquetas individuales, produciendo alrededor de 2,000 a 5,000 plaquetas nuevas por megacariocito. El flujo sanguíneo ejerce un estímulo mecánico sobre las proplaquetas, lo que provoca una tracción hasta que se liberan las plaquetas (ver Figura 4).

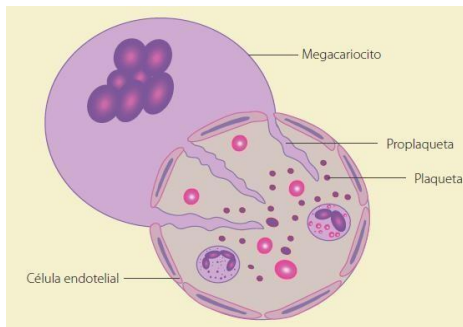


Figura 4. Diagrama de la trombopoyesis. Se puede ver un megacariocito que está extendiendo sus proplaquetas hacia el interior de una sinusoide. El flujo sanguíneo contribuye a separar las plaquetas de las proplaquetas y concluir su liberación en el torrente sanguíneo.

Fuente: <https://www.scielo.org.mx/img/revistas/facmed/v62n1/2448-4865-facmed-62-01-6-gf4.jpg>

Hay otros elementos que intervienen en la trombopoyesis; por ejemplo, las especies reactivas de oxígeno (ROS) son parte del proceso de maduración de los megacariocitos y del proceso de formación y fragmentación de las proplaquetas. La producción de plaquetas también es estimulada por el sistema nervioso simpático, al promover que los megacariocitos se adhieran y migren y que las proplaquetas se formen.

La teoría de la fragmentación explosiva es otro modelo de trombopoyesis. En este, el megacariocito muestra formas parecidas a ampollas, ondulaciones y protrusiones, así como áreas en el citoplasma con membranas internas que delimitan plaquetas preformadas que se liberan al fraccionarse el citoplasma. Se sugiere que esto ocurre cuando es necesario incrementar rápidamente las concentraciones de plaquetas sanguíneas, ya sea en contextos proinflamatorios o tras una pérdida aguda de plaquetas.

La caspasa 3 tiene que estar activa para que las plaquetas se formen. Las plaquetas activadas y las células endoteliales dañadas producen IL1 α (interleucina 1 α), que activa a la caspasa 3 en megacariocitos maduros sin inducir la apoptosis celular. La vía clásica de trombopoyesis produce un número 20 veces menor de plaquetas que la mediada por IL1 α , y estas últimas son más grandes y funcionalmente normales.

5.2 ¿Qué Funciones Cumplen los Megacariócitos?

5.2.1. Producción de trombocitos

Los megacariocitos tienen como función principal la generación de plaquetas. Por lo tanto, es relevante señalar la función de las plaquetas en la hemostasia (creando el coágulo primario), así como en la respuesta inmunitaria innata, la reparación de heridas y la inflamación.

Gran parte de las funciones que realizan están definidas por los componentes de la membrana y el contenido de sus gránulos, los cuales provienen de los megacariocitos. La adhesión y la agregación de plaquetas dependen, por ejemplo, de las glucoproteínas de membrana y del factor de Von Willebrand (VW), que se presentan desde los primeros estadios de la megacariopoyesis.

Los diferentes elementos de crecimiento que el megacariocito produce y guarda en los gránulos alfa contenidos en las plaquetas, tienen como propósito la multiplicación de fibroblastos y la producción superior de colágeno y matriz extracelular en general. Esto es esencial para el rol que cumplen las plaquetas en la reparación de tejidos y la cicatrización.

Finalmente, se le concede cada vez más relevancia a la función que cumplen las plaquetas en la respuesta inmune. Para ello, estas presentan varias moléculas generadas por el megacariocito, como la p-selectina o CD62P, que interviene en la adhesión de plaquetas con leucocitos; o los receptores Toll (TLR), que son moléculas capaces de detectar ciertos microorganismos y representan el primer paso para que las plaquetas produzcan interleucinas o sustancias bactericidas que estimulan a otros leucocitos o neutrófilos.

5.2.2 Los megacariocitos colaboran en la conservación del tejido óseo.

Los megacariocitos también cumplen la función de intervenir en la homeostasis del tejido óseo, según se ha comprobado en investigaciones in vivo e in vitro realizadas en modelos animales y en pacientes humanos. Los megacariocitos, debido a que expresan determinadas proteínas que son capaces de estimular (por ejemplo, RANKL) o inhibir la formación de osteoclastos (como la osteoprotegerina [OPG]), regulan la proliferación y diferenciación de estos.

Por otra parte, incrementan la producción de osteoblastos que, bajo el efecto de los megacariocitos, también aumentan la síntesis de matriz ósea. En particular, se observa un aumento en su producción de colágeno tipo I, fosfatasa alcalina, osteocalcina y osteoprotegerina.

Se ha comprobado que en modelos animales con sobreexpresión de TPO, en los que hay una elevación de megacariocitos, estos generan más cantidad de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento transformante b (TGFb). Esto provoca un incremento en la densidad ósea, ya que ambos factores estimulan la proliferación de osteoblastos y la producción de matriz ósea.

Dentro de este modelo, los megacariocitos producen más osteoprotegerina, lo que previene la creación de osteoclastos. Los megacariocitos no maduran adecuadamente y aparecen megacariocitos con trombocitopenia en ratones que tienen escasez de los factores de transcripción NF-E2 o GATA-1, lo cual está relacionado con un incremento en la masa ósea.

Tanto en humanos como en animales, cuando se presenta la enfermedad de von Willebrand, se puede notar que los megacariocitos aumentan. En este caso, también la densidad ósea aumenta y los marcadores de reabsorción ósea disminuyen.

5.2.3. Los megacariocitos controlan la multiplicación y la inactividad de las CTH.

Hay investigaciones que muestran que los megacariocitos pueden controlar la quiescencia y, en ciertas circunstancias, incrementar la proliferación de las CTH.

Algunos factores de crecimiento generados por los megacariocitos, como la serotonina, el PDGF y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), son determinantes para que estas células se autorrenueven. En realidad, se ha observado en cultivos de CTH que, si se desarrollan con megacariocitos, su crecimiento es mucho mejor.

En modelos animales de trasplantes de médula ósea, las CTH se ubican principalmente al lado de los megacariocitos y la inhibición de estos últimos no permite que el trasplante tenga éxito. Originalmente se creía que este efecto era consecuencia de los megacariocitos, ya que activaban a los osteoblastos en el nicho osteoblástico. Sin embargo, actualmente se ha comprobado que el efecto es directo.

La producción del factor de crecimiento fibroblástico 1 (FGF1) por los megacariocitos favorece la multiplicación de las CTH. Se ha observado a nivel experimental que los megacariocitos incrementan la producción de FGF1 tras ser tratados con quimioterapia, lo cual favorece la hematopoyesis y permite que la médula ósea se recupere.

No obstante, la proliferación de las CTH está altamente regulada; en realidad, la mayor parte de estas células se halla en una fase quiescente o no proliferativa. Los megacariocitos, en un estado basal de la médula ósea, limitan la multiplicación y promueven la inactividad de estas células.

La quiescencia de las CTH es causada por el CXCL4, conocido también como factor plaquetario 4, y el TGFb, los cuales son generados por células del estroma y megacariocitos.

La interacción entre los osteoblastos, los megacariocitos y los osteomas es esencial para preservar el nicho en el que tienen lugar las células madre hematopoyéticas, según se ha evidenciado en diversas investigaciones.

Los megacariocitos son los que estimulan a los osteomas, una clase particular de macrófagos (fenotipo CD45+ F4/80) que se pueden identificar sin dificultad en la calota neonatal. Estas interacciones celulares son fundamentales para mantener las CTH, que al final están asociadas con la correcta diferenciación de todos los linajes de la hematopoyesis.

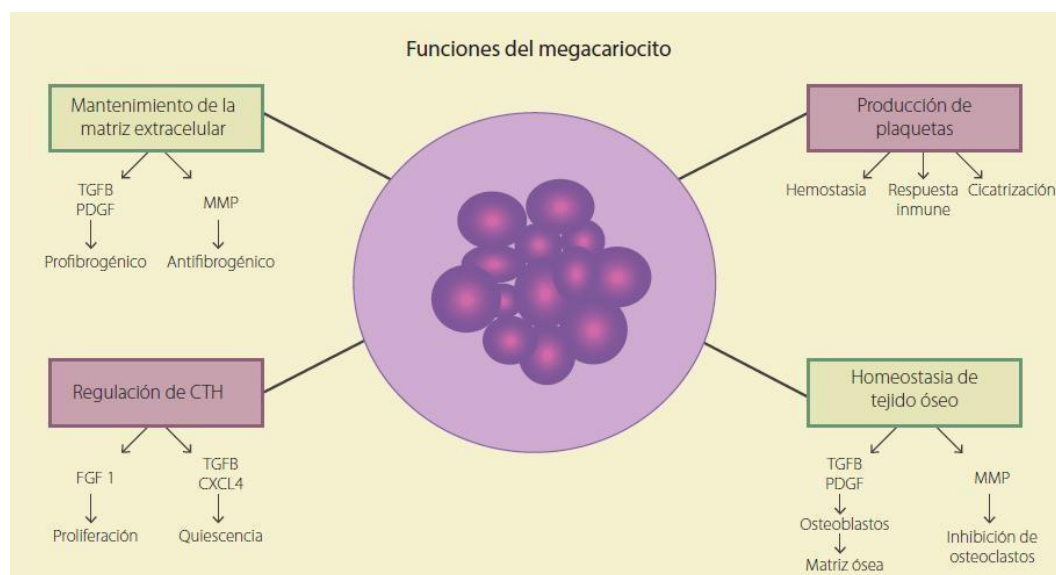
5.2.4. Los megacariocitos juegan un papel importante en el mantenimiento de la matriz extracelular y participan en el desarrollo de la mielofibrosis.

Los megacariocitos producen factores que son pro-fibrogénicos y otros que son anti-fibrogénicos. Las metaloproteinasas (MMP), como la MMP-2, MMP-9, MMP14, MMP-24 y MMP-25, son ejemplos de anti fibrogénicos que descomponen diferentes elementos de la matriz extracelular. Esta función es relevante para que los megacariocitos se trasladen del nicho osteoblástico al vascular, además de permitir la generación de proplaquetas en las sinusoides y la extensión de sus podosomas.

No obstante, se observa un mayor riesgo de mielofibrosis o fibrosis medular en pacientes con neoplasias mieloproliferativas y en modelos animales, así como en aquellos que padecen enfermedades donde los megacariocitos proliferan, por ejemplo, la leucemia megacarioblástica aguda.

Estos megacariocitos patológicos incrementan la secreción y síntesis de factores pro fibrogénicos, como el PDGF y TGFb, que fomentan la activación y proliferación de fibroblastos; estos últimos, a su vez, incrementan su producción de colágena I y III, lo cual propicia que se produzca fibrosis.

La función de los megacariocitos en esta complicación es un asunto investigativo que todavía tiene mucho por revelar y que podría ser utilizado como un objetivo terapéutico o preventivo para la mielofibrosis. En la Figura 5, se sintetizan las funciones más relevantes.



Fuente: Tomado <https://www.scielo.org.mx/img/revistas/facmed/v62n1/2448-4865-facmed-62-01-6-gf4.jpg>

Figura 5. Resumen de las principales funciones del megacariocito

5.3. Señales de Activación de los Factores que Intervienen para la Formación del Coágulo

Tomado de Flores-Rivera OI, Ramírez-Morales K, Martín Meza-Márquez, JM, Nava-López JA, Revista Mexicana de Anesteología 2014, 37(2), S382-S386

Las plaquetas son uno de los componentes cruciales, y estas albergan en su interior el factor "Von Willebrand". Cuando una arteria o vena se daña, este factor se libera del interior de las plaquetas. Las células del endotelio permiten entonces la fuga de sangre en la región afectada.

Esto también puede ocurrir debido a la muerte celular súbita o programada (apoptosis) de las células endoteliales. Los elementos que contribuyen a la coagulación y evitan que una lesión endotelial o un traumatismo provoquen el derrame de sangre se presentan.

Después de un daño a los vasos sanguíneos, el proceso que preserva la integridad de un sistema circulatorio cerrado y con alta presión se llama hemostasia. La extravasación sanguínea y el daño en la pared vascular dan lugar de manera acelerada a los sucesos requeridos para reparar el perjuicio.

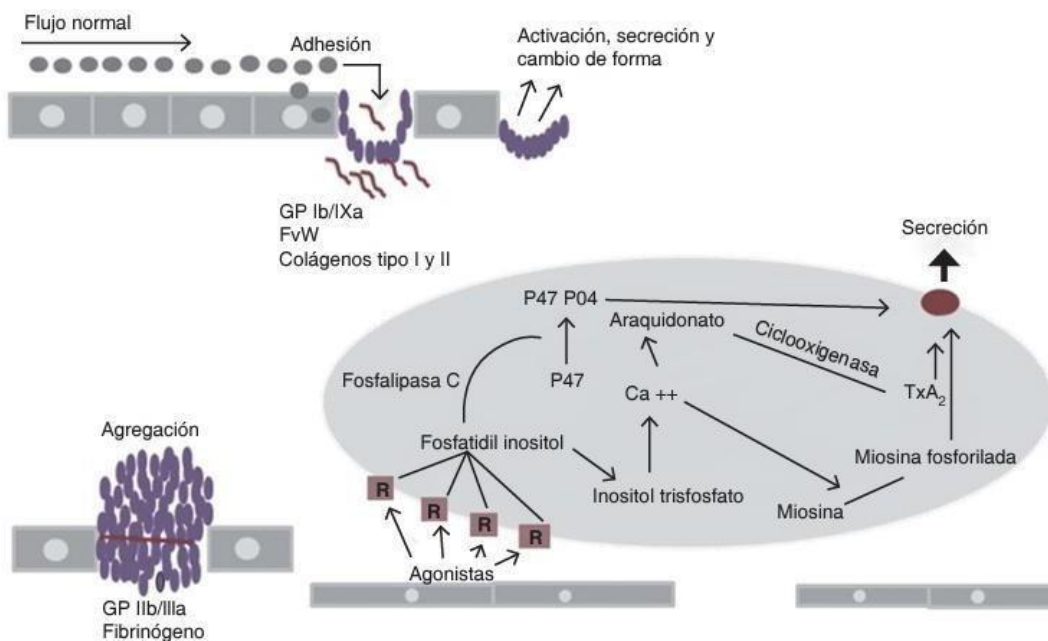
Para su análisis, la hemostasia se divide en primaria y secundaria. La hemostasia primaria se distingue por la activación y el reclutamiento de plaquetas para crear un tapón plaquetario, en tanto que la secundaria lo hace por activar el sistema de coagulación para generar fibrina. Por último, se muestra la cascada de fibrinólisis, que tiene como función descomponer el coágulo cuando el daño en los tejidos o los vasos sanguíneos ya ha sido reparado.

5.3.1 Hemostasia primaria. Es la formación del tapón plaquetario que comienza cuando hay una lesión en el vaso sanguíneo y se produce una interacción cercana entre la plaqueta y el endotelio. Por lo general, las plaquetas no se adhieren a los vasos sanguíneos; esto solo sucede cuando hay una lesión en el vaso sanguíneo y la colágena del subendotelio queda expuesta, lo que facilita la activación de las plaquetas. En la hemostasia primaria, hay un conjunto de procesos que se activan durante una lesión vascular y que posibilitan la creación del tapón plaquetario hemostático. Los mecanismos mencionados se organizan en las etapas siguientes: 1) adhesión, 2) activación y secreción, y 3) agregación.

Cuando hay una lesión vascular, las plaquetas se adhieren al tejido perivascular o subendotelio que está expuesto a la sangre. La adhesión plaquetaria es el nombre de este primer proceso. Pese a que el endotelio contiene diversas proteínas adhesivas, la proteína más relevante para la adhesión de las plaquetas es el colágeno. Las plaquetas se unen de manera dependiente a proteínas adhesivas a través de receptores específicos para cada una de estas últimas que se encuentran en la membrana plaquetaria. La plaqueta se une al colágeno a través del factor de von Willebrand (FvW) y la GPIb/IX. El FvW, al unirse con el colágeno, lo transforma y posibilita que la GPIb/IX se adhiera, fijando así la plaqueta en el colágeno. Cuando se activan, las plaquetas cambian su forma y se transforman en esferas que tienen pseudópodos.

Al mismo tiempo, tiene lugar la secreción de componentes activos que se guardan en los gránulos plaquetarios (factor V, tromboxano A₂, factor de crecimiento derivado de plaquetas, calcio serotonina, adenosina trifosfato y fibrinógeno). La creación del coágulo plaquetario y la curación de los tejidos se aceleran con algunas de estas sustancias que son consideradas agonistas, como trombina, epinefrina, adenosin trifosfato, colágeno o tromboxano A₂. La agregación plaquetaria es el proceso mediante el cual los agonistas inducen que unas plaquetas se unan con otras, atraigan más plaquetas y aumente el tamaño del coágulo. En esta etapa, el coágulo es una aglomeración de plaquetas

degranuladas que están empaquetadas de manera apretada y tienen muy poca fibrina a su alrededor. La GPIIb/IIIa, que es el receptor del fibrinógeno, y el fibrinógeno son necesarios para la agregación. La membrana de las plaquetas activadas, al suministrar los fosfolípidos requeridos para la creación del coágulo definitivo, especialmente una lipoproteína llamada factor plaquetario 3, proporciona también el entorno óptimo para que la generación de fibrina se acelere. Asimismo, la membrana plaquetaria activada tiene otros lípidos de fosforina, que son ligandos para los factores Va, VIIIa, IXa y Xa. Acelera y localiza la activación del factor II y X en el lugar de la lesión vascular, además de proteger al factor Xa contra la inhibición por AT III (ver Figura 6).



Fuente: Tomada de <https://miguenursing.weebly.com/papers-acadeacutemicos/hemostasia-y-el-uso-del-tromboelastografo>

Figura 6. Etapas de la cascada de señalización plaquetaria posterior al daño en los vasos sanguíneos. La unión de las plaquetas al subendotelio está condicionada por la presencia de colágeno, el factor de von Willebrand (FvW) y GPIb/IXa. El puente es el fibrinógeno y la GPIIb/IIIa es lo que determina la agregación. El araquidonato se transforma en tromboxano A2 (TxA₂), un agente vasoconstrictor y agonista, mediante la enzima ciclooxigenasa.

5.3.2 Hemostasia secundaria

La hemostasia secundaria, que incluye la activación del sistema de coagulación, se segmenta en tres etapas según el modelo celular: iniciación, amplificación y propagación.

1. Comienzo. El factor tisular (FT), también llamado tromboplastina o factor III, se produce en varias clases celulares y está presente en la membrana de las células. A pesar de que el factor tisular está localizado en la membrana celular donde se genera, puede expresarse en un amplio espectro de células extravasculares en situaciones normales, y también en monocitos y células endoteliales cuando hay inflamación. Pruebas recientes indican que las vesículas con membrana que contienen factor tisular son capaces de acoplarse a la superficie plaquetaria de un trombo en formación. Aunque el papel y la fuente de esas vesículas no están claros, es obvio que las plaquetas normales en circulación no activadas no poseen ni manifiestan factor tisular. El comienzo de la hemostasia secundaria requiere que haya una lesión endotelial, para posibilitar que el plasma se encuentre con el factor tisular expresado en las membranas celulares. El factor VII es una proteína que depende de la vitamina K y se genera en el hígado; tiene la vida media más breve de todos los factores procoagulantes y es la única que fluye tanto activada como no activada. Los factores IXa, Xa, XIIa, trombina, plasmina y la proteasa activadora del factor VII tienen la capacidad de activar el factor VII. Aún se desconoce cuál es el activador fisiológico más relevante del factor VII, aunque hay algunas pistas que indican un proceso de autoactivación. El factor IX parece tener un rol crucial en la activación del factor VII, ya que los individuos con hemofilia B presentan niveles bajos de este último. El factor VII, cuando se encuentra en el plasma, se conecta de manera estrecha con el factor tisular y activa rápidamente a proteasas que son procoagulantes y anticoagulantes. El factor IX y el X pueden ser activados por el complejo FT/VIIa. El factor X activa al factor V y a otras proteasas no coagulantes, pero puede ser inhibido con rapidez por el inhibidor del factor tisular (que en inglés se abrevia TFPI) o por la antitrombina III (ATIII), si deja el entorno protector de

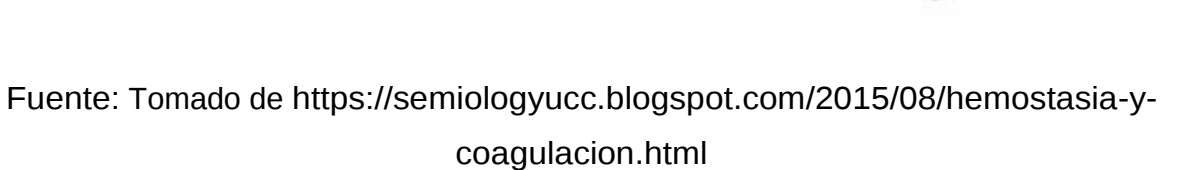
la superficie celular. El FT/VIIa es capaz de autoactivarse. La vida media del factor VIIa libre es de dos horas y las proteasas plasmáticas no pueden inactivarlo. El factor VIIa es resguardado de la inactivación a menos que esté asociado con el FT, y su función principal es supervisar la circulación y localizar áreas donde el FT esté expuesto para activar la circulación. Por otra parte, el factor Xa que se mantiene en la superficie celular tiene la capacidad de unirse con el factor Va para generar una cantidad reducida de trombina. Este es un proceso crucial en la activación del factor VIII y de las plaquetas durante la fase de amplificación.

2. Aumento. En la etapa de iniciación, se producen pequeñas dosis de trombina que impactan de manera distinta en diversas áreas de la coagulación. La trombina es un activador plaquetario muy potente mediante la vía de los receptores que son activados por proteasas (PAR, por sus siglas en inglés). La fase de amplificación se conoce como el periodo protrombótico ascendente, que da lugar a la activación de las plaquetas con la exposición de los fosfolípidos de membrana y a la formación de una membrana procoagulante mediante la liberación del contenido de sus gránulos. Las plaquetas sueltan, durante la activación, el factor V parcialmente activado de sus gránulos alfa hacia la superficie, el cual es totalmente activado por el factor Xa y la trombina. El factor XI también se activa por la trombina. La trombina, por otra parte, corta el factor de von Willebrand (FvW) del factor VIII para activarlo después. Las plaquetas que se reclutan en el lugar de la lesión durante esta etapa suministran los fosfolípidos de membrana requeridos para la fase de propagación.
3. Propagación. Durante la etapa inicial, los factores IX y X se activan correctamente, al igual que los cofactores VII y V (los cuales son activados por la mínima cantidad de trombina generada en esta fase). Posteriormente, el VIIIa y el IXa se unen a la membrana plaquetaria y crean un complejo de tenaza. El complejo de "ten asa" hace que el factor X se active, lo que lleva a la formación rápida de Xa. Este complejo está formado por los factores IXa, VIIIa, X y calcio. La mayor parte del factor Xa se produce de manera fisiológica mediante la actividad del complejo de tenaza y no por medio de la activación del complejo

El diagrama ilustra la cascada de coagulación sanguínea, organizada en tres etapas principales:

- 1. Inicial:** Se muestra la activación de la Factor X (X) por el complejo de Factor Tissue (FT) y Factor VIIa, y por el complejo de Factor XII, XI y IX. La Factor X activada (Xa) convierte la Protrombina en Trombina.
- 2. Amplificación:** La Trombina, en presencia de Ca^{2+} y el Factor de Liberación de Plaquetas (FLa), activa los factores V, VIII y XI. La activación de V produce Va, de VIII produce VIIIa y de XI produce XIa. La activación de VIII por XIa produce VIIIa. La activación de V por VIIIa produce Va. La activación de XI por VIIIa produce XIa. La activación de IX por XIa produce IXa.
- 3. Propagación:** La Trombina activa el Factor V a Va. La Va, junto con IXa y VIIIa, activa el Factor X a Xa. La Xa, junto con Va y VIIIa, activa la Protrombina a Trombina. La Trombina, en presencia de Fibrinógeno, convierte el Fibrinógeno en Fibrina.

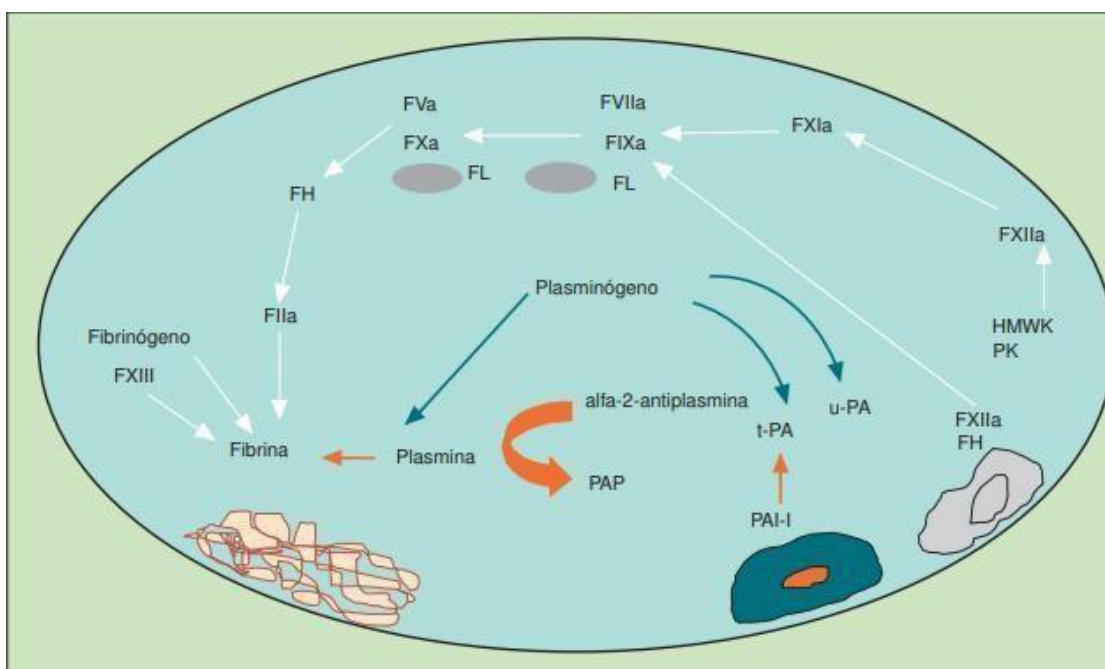
Adicionalmente, se muestra la activación de la Plaqueta activada (PLA) por la Trombina y el Ca^{2+} , lo que libera el FLa.



5.4 Fibrinólisis y Anticoagulación

Tomado de Espinosa G, Reverter JC. Coagulación y fibrinólisis plasmática. Estados de hipercoagulabilidad. Medicina Integral 2001, 38 (4), 156-166

La fibrinólisis es un sistema enzimático que incluye una secuencia de inhibidores y activadores, los cuales controlan cómo se transforma el plasminógeno en plasmina. La lisis de la fibrina se produce cuando hay generación de plasmina libre en el trombo, lo que resulta en productos de degradación de la fibrina (ver Figura 8).



Fuente: Tomado de <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-coagulacionfibrinolisis-plasmatica-estados-hipercoagulabilidad-13018800>

Figura 8. Bioquímica de la fibrinólisis.

La regulación del sistema de fibrinólisis se produce a través de interacciones moleculares concretas que tienen lugar entre sus componentes fundamentales, así como por la síntesis y liberación subsiguiente desde las células endoteliales de los inhibidores y activadores del plasminógeno. Por lo tanto, si la actividad del sistema de fibrinólisis se eleva, esto puede propiciar que ocurran trastornos hemorrágicos; por el contrario, un defecto en la actividad fibrinolítica puede predisponer a trombosis.

5.4.1 Bioquímica del sistema de la fibrinólisis.

Las enzimas del sistema de la fibrinólisis son proteasas serínicas, lo que significa que su locus activo está formado por los aminoácidos serina, histidina y ácido aspártico, generando así la región catalítica.

En las moléculas, este locus activo se encuentra en la zona carboxi-terminal, mientras que las zonas amino-terminales albergan uno o más dominios tanto funcionales como estructurales, por ejemplo, los dominios kringle, el dominio factor de crecimiento epidérmico (EFG) y los dominios finger (de manera análoga a los finger de la fibronectina).

Los inhibidores del sistema fibrinolítico pertenecen a la superfamilia de las serpinas, que son inhibidores de las serinproteasas. En este caso, en el extremo carboxiterminal tienen un péptido reactivo específico (X-lisina o X-arginina) que se encuentra unido a su enzima. Esto resulta en una estructura inactiva con la función de inhibir las enzimas. La tabla 2 sintetiza las propiedades genéticas y químicas de los elementos más importantes del sistema de la fibrinólisis.

Tabla 2. Características químicas y genéticas de los componentes de la fibrosis

Cromosoma	
Plasminógeno	6
t-PA	6
U-PA	10
α 2-amtiplasma	18
PAI-I	7
PAI-2	18
U-PAR	19

Tomado y adaptado de Espinosa G *et al* 2001

5.4.1.1 Plasminógeno. El plasminógeno humano es una glucoproteína de cadena simple con 92 kD compuesta por 791 aminoácidos y 24 puentes disulfuro⁸. La molécula se estructura en siete dominios, que son los siguientes: "péptido de preactivación" (aminoácidos 1-77), cinco dominios secuenciales homólogos conocidos como kringle (cada uno está formado por tres lazos unidos a través de puentes disulfuro y tiene 80 aminoácidos) y el dominio proteasa (aminoácidos 562-791). La lisina está presente en los dominios kringle en las ubicaciones concretas que median la interacción del plasminógeno con la fibrina y la de la plasmina con la α 2-antiplasmina. Por lo tanto, juegan un papel fundamental en la identificación de la fibrina, de la superficie celular y de la α 2-antiplasmina.

Cuando se rompe la unión entre Arg561 y Val562, el plasminógeno se transforma en plasmina. El brazo largo del cromosoma 6, específicamente en las bandas q27 o q26, es donde se encuentra el gen del plasminógeno. Este se compone de diecinueve exones y dieciocho intrones. Dos exones, separados por un intrón que se ubica en el centro de cada estructura, componen cada uno de los cinco dominios kringle.

5.4.1.2 Activador tisular del plasminógeno. El activador tisular del plasminógeno (t-PA) es una proteasa de serina que tiene un peso de 68 kD y está formada por 530 aminoácidos. La molécula está estructurada en varios dominios, incluyendo el dominio finger que abarca los aminoácidos del 4 al 50, el dominio EFG que incluye los aminoácidos del 50 a los 87 y dos dominios kringle, que abarcan respectivamente los aminoácidos del 87 al 176 y del 176 al 262. Estos últimos se encuentran en la porción aminoterminal de la molécula. En el lado carboxi-terminal, sin embargo, está situado el dominio de la proteasa que incluye los aminoácidos 276-527. Esta zona se denomina región catalítica. Estas distintas áreas median diversas funciones en la enzima. Por lo tanto, la unión del t-PA a la fibrina está principalmente mediada por el segundo de los dominios kringle y el dominio finger. Por otro lado, la t-Pa es descompuesta por la plasmina a través de la hidrólisis del puente Arg275-Ile276, lo que resulta en una estructura inactiva

de doble cadena. El gen del t-PA, ubicado en el cromosoma 8 (en las bandas 8.p.12-q.11.2), está formado por catorce exones y trece intrones.

5.4.1.3 Urocinasa: La prourocinasa o scu-PA es una glucoproteína que tiene un peso de 54 kD y está compuesta por 411 aminoácidos. En esta situación, el dominio EFG y un dominio kringle están situados en la región aminoterminal, mientras que la tríada catalítica está en la punta carboxiterminal. La unión del scu-PA a su receptor, que se encuentra en la superficie de una variedad de células, es realizada por el dominio EFG.

La unión Lis158-Ile159 se rompe, lo que hace que la scu-PA se convierta en tcu-PA o urocinasa. El cromosoma 10 es donde se ubica el gen de la tcu-PA. El gen tiene 11 exones y la disposición de intrón-exón es muy parecida a la del gen de la t-Pa.

5.4.1.4 Receptor de la urocinasa activadora de plasminógeno. El receptor del activador del plasminógeno tipo urocinasa (u-PAR) es una glucoproteína que tiene un peso molecular de 50-60 kD y está formada por 313 aminoácidos. Se conecta con la tcu-PA mediante los dominios EFG de esta última.

Constituido por tres dominios estructurales homólogos, es el fragmento aminoterminal el que se acopla a la tcu-PA¹³. La activación de la tcu-PA parece depender de la unión de scu-PA y u-par.

Esta combinación genera más plasmina porque, por un lado, activa el plasminógeno y, por otro lado, la plasmina generada activa a su vez a scu-PA en tcu-PA. El cromosoma 19 contiene el gen de la u-par, ubicado en las bandas q13.1-q13.2 y compuesto por siete exones.

5.4.1.5 Alfa-2-antiplasmina. La molécula de α_2 -antiplasmina fue descrita originalmente como una glucoproteína de 452 aminoácidos.

Es conocido que la estructura de esta glucoproteína de 70 kD¹⁵ está compuesta por 464 aminoácidos. El extremo carboxiterminal de 51 aminoácidos presenta un locus secundario de unión que responde a los sitios de unión de lisina del plasminógeno y la plasmina¹⁶, lo que le confiere una particularidad única en las serpinas. El cromosoma 18, específicamente en las bandas p11.1-q11.2, contiene el gen de la α_2 -antiplasmina. El exón IV es responsable de codificar la zona aminoterminal donde se localiza el punto de unión de la fibrina, y está compuesto por 10 exones. Por otro lado, el exón X es el encargado de codificar la región carboxiterminal, donde se encuentra la ubicación de unión para el plasminógeno.

5.4.1.6 Inhibidor del activador tisular del plasminógeno. El PAI-1 y el PAI-2 son los dos inhibidores más importantes del activador tisular del plasminógeno (PAI). La glucoproteína de cadena única PAI-1, que tiene 52 kD, se forma a partir de 379 aminoácidos¹⁷. La proteína S o vitronectina es la que estabiliza la molécula de PAI-1 al unirse con ella.

El PAI-1 está constituido por 9 exones y se encuentra en el cromosoma 7, específicamente en las bandas q21.3-q22. El PAI-2 es una serpina compuesta por 393 aminoácidos¹⁸, y tiene dos variantes distintas con propiedades cinéticas parecidas: una variante no glucosilada de 47 kDa, que se encuentra dentro de la célula, y otra glucosilada de 60 kDa.

La enzima de unión PAI-2, la tcu-PA, es extracelular; por lo tanto, no se conoce la función intracelular de PAI-2. Se cree que podría actuar como un pozo del que el PAI-2 podría liberarse si se produce un daño celular. El PAI-2 se encuentra en el cromosoma 18, específicamente en las bandas q21-q23. Su estructura es un poco

diferente a la del PAI-1 y tiene 8 exones.

Todos los activadores del plasminógeno transforman a este en plasmina mediante la ruptura de la unión Arg561-Val562, lo que se conoce como activación del plasminógeno.

La plasmina es una molécula con dos cadenas, una ligera que incluye la zona catalítica (Ser741, Asp646 y His603) y una pesada que contiene los cinco kringles (el extremo aminoterminal de la molécula de plasminógeno).

5.4.1.7 Inhibición de la plasmina por α_2 -antiplasmina

La α_2 -antiplasmina, junto a la plasmina, da lugar a un complejo 1:1 que no está activo. Esta inhibición se realiza a través de dos reacciones sucesivas:

La primera reacción, que es rápida, genera un complejo inactivo reversible; después viene una segunda reacción, más lenta, que da como resultado un complejo inactivo irreversible. La vida media de las moléculas de plasmina producidas en la superficie de la fibrina es entre dos y tres veces más larga que la de la fibrina libre o en circulación.

5.4.2 Mecanismo de acción del activador tisular del plasminógeno

En presencia de fibrina

La t-Pa es una enzima con escasa actividad sin la presencia de fibrina. No obstante, en presencia de esto, el nivel de activación del plasminógeno se incrementa significativamente. Es fundamental que la trombina forme los monómeros de fibrina y que estos se polimericen para estimular el plasminógeno a partir del t-PA.

La estimulación óptima solo se logra tras la ruptura temprana de las cadenas A α y B β de la fibrina, que dan lugar a los polímeros X. Hay información que indica que el t-PA y el plasminógeno forman un complejo ternario en la superficie de la fibrina. El complejo que se forma provoca un incremento en la afinidad del t-PA por el plasminógeno.

El inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI) se ha caracterizado recientemente; este se activa mediante el complejo trombina-trombomodulina. Es una carboxipeptidasa que suprime la fibrinólisis, eliminando residuos de Arg o Lys en el extremo carboxi-terminal de la fibrina parcialmente descompuesta.

De esta manera, evita la lisis de la fibrina por parte de la plasmina que ha sido activada por el t-Pa.

Algunas clases celulares, en la superficie celular, tienen la habilidad de unirse a los activadores del plasminógeno y al plasminógeno mismo en su superficie. Esto provoca que la activación del plasminógeno aumente y que, simultáneamente, proteja a la plasmina unida de ser inhibida por el $\alpha 2$ -antiplasmina.

Hay investigaciones que han comprobado que el endotelio controla la fibrinólisis pericelular mediante la modulación de la expresión de los receptores del plasminógeno. Se ha sugerido que la t-Pa unida a la superficie celular mantiene su actividad enzimática y, además, queda protegida de la inhibición del PAI-1. Esto se debe a una proteína de membrana de 40 kD (asociada con la anexina II), que se ha planteado como el receptor funcional de la t-Pa. Por consiguiente, la combinación del plasminógeno y sus activadores con el endotelio vascular promueve la producción de plasmina y podría desempeñar un papel significativo en la preservación del flujo sanguíneo. Además, estos receptores celulares tienen la capacidad de participar en la rápida eliminación de t-Pa del torrente sanguíneo. Por lo tanto, las células endoteliales del hígado tienen receptores que identifican los kringle 1 y las células parenquimatosas hepáticas poseen un receptor dependiente de calcio que puede interactuar con los dominios EFG y/o finger de la t-Pa. Los hepatocitos también tienen receptores de alta afinidad para unirse y degradar los complejos t-PA/PAI, así como la capacidad de acoplarse a t-PA circulante con una menor afinidad.

5.4.3 Mecanismo de acción de la urocinasa

En presencia de fibrina

La scu-PA es estable en el plasma, si no hay fibrina presente, y no activa el plasminógeno. La scu-PA provoca la lisis específica del coágulo de fibrina en su presencia²⁹. Asimismo, la α 2-antiplasmina evita que scu-PA se convierta en tcu-PA fuera del coágulo y preserva su especificidad por la fibrina.

La scu-PA es estimulada específicamente por el fragmento E-2 de la fibrina para activar el plasminógeno. Scu-PA, por lo tanto, es un activador deficiente del plasminógeno cuando este está unido a los residuos de lisina de la fibrina intacta; sin embargo, tiene una actividad elevada con el plasminógeno que se encuentra vinculado a los residuos de lisina del extremo carboxiterminal, generados por la fibrina parcialmente degradada.

En la superficie de las células

La activación de la scu-PA en condiciones fisiológicas depende esencialmente de la unión de esta a la u-par. Esta combinación, tal como se ha dicho previamente, causa que la producción de plasmina se incremente. Esto ocurre debido a que el plasminógeno se activa y también porque la plasmina generada activa por retroalimentación al scu-PA en tcu-PA.

La plasmina unida a la célula está a salvo de su inactivación por la α 2-antiplasmina; además, se promueve la activación de la scu-PA que está vinculada con su receptor. El PAI-1 y el PAI-2 son capaces de inhibir este sistema de manera efectiva. Aunque se ha propuesto que el plasminógeno se activa mediante un complejo que depende de la u-par, no se conocen los mecanismos actuales de funcionamiento de este receptor.

El PAI-1 interactúa con la t-cu-PA, la t-PA de doble y de cadena simple, pero no con la scu-PA. Esta reacción rápida es provocada por las áreas de la molécula de t-PA y t-cu-PA que tienen carga positiva. La vía hepática es la encargada de eliminar el PAI-1 del torrente circulatorio. En cambio, el PAI-2 presenta una inhibición de la t-cu-PA más lenta que la del PAI-1. Además, tiene un efecto sobre la t-PA de doble cadena que es efectivo, aunque su efecto es menos fuerte en la t-PA de cadena simple y no inhibe la scu-PA.

5.4.4 Síntesis y secreción de los activadores del plasminógeno

Las células endoteliales producen t-PA y lo liberan en la corriente sanguínea. Se ha evidenciado que estas células producen más t-PA cuando hay daño arterial y que la estimulación del endotelio vascular, ya sea mediante ejercicio físico, infusión de DDAVP o epinefrina u oclusión venosa, genera una rápida liberación (en minutos) de t-PA³⁴.

Esta respuesta es demasiado rápida como para explicarse simplemente con un incremento en la síntesis de t-PA, por lo que podría ser el resultado de la liberación de depósitos celulares de t-PA, a pesar de que no se ha corroborado su existencia. La trombina, por ejemplo, es una sustancia que favorece la liberación de t-PA de las células endoteliales y al mismo tiempo promueve la secreción de PAI-1.

La producción de t-PA por las células endoteliales también se ve aumentada debido a una amplia gama de compuestos, incluyendo la proteína C activada, la trombina, el factor de crecimiento fibroblástico y la histamina. La trombina y la histamina, que son sustancias vasoactivas, regulan la producción de t-PA mediante la activación de la fosfolipasa C. Al activar esta enzima, se activa también la proteinquinasa C. Mientras esta síntesis de t-PA tiene lugar fundamentalmente en las células endoteliales, la de scu-PA se produce en otras

variedades celulares del organismo, como fibroblastos, células epiteliales y neumocitos.

5.4.5 Síntesis y secreción de los inhibidores de los activadores del plasminógeno

El hecho de que el ARNm de PAI-1 esté presente en una amplia gama de tejidos indica que muchas y variadas clases celulares, como las células del músculo liso o el endotelio, pueden ser su sitio de producción. El PAI-1 se encuentra en el plasma, las plaquetas, la placenta y la matriz fuera de las células.

El PAI-1 no se almacena en las células, con la excepción de las plaquetas, que contienen principalmente PAI-1 inactivo; sino que se secreta rápidamente luego de su síntesis. Por tanto, tiene un ritmo circadiano con una concentración plasmática más alta por la mañana y más baja por la tarde y la noche. En cambio, el t-PA muestra una variación circadiana inversa.

Distintos agonistas, como hormonas, factores de crecimiento, endotoxinas y citocinas, regulan la síntesis y secreción de PAI-1. Los lipopolisacáridos, la interleucina 1, el factor de necrosis tumoral alfa, el de crecimiento fibroblástico, las lipoproteínas de densidad muy baja, la trombina y la insulina son todos factores que estimulan la expresión del gen PAI-1 en las células endoteliales.

En las células endoteliales que están al lado del coágulo, en las células del músculo liso de la neoíntima y en los macrófagos, la expresión de ARNm se ha incrementado y se ha podido medir PAI-1. El incremento de su expresión en la pared arterial, provocado por la trombosis, tiene el potencial de generar un desbalance entre esta y la fibrinólisis, favoreciendo a la primera. Se ha detectado el PAI-2 en la placenta y en el plasma de mujeres embarazadas; además, es secretado por los leucocitos y las células de fibrosarcoma. La endotoxina, que estimula la transcripción del gen del PAI-2, activa su secreción.

5.5 Factores de riesgo Trombótico

Los estados hipercoagulables congénitos se componen de anomalías protrombóticas bien definidas, que en su mayoría son hereditarias. Históricamente, se han investigado estos factores genéticos trombofílicos en familias con propensión a sufrir trombosis.

La estimación de cuántas personas en la población general tiene estas anomalías es de 1 por cada 3.000-5.000 personas. Por otro lado, entre el 40 y el 60% de los enfermos con un primer episodio de trombosis venosa puede presentar una o más anomalías trombofílicas. No obstante, la prevalencia de estos factores en pacientes con trombosis es muy variable y fluctúa entre el 20 % del factor V de Leiden y el 1 % del déficit de antitrombina (Tabla 3). Por último, se están examinando en estos momentos nuevas anomalías, entre las que sobresalen muchos polimorfismos (de las proteínas C y S, de la t-Pa y tcu-PA, del PAI-1 y de los factores II, VII, XII y XIII), siendo probablemente los valores plasmáticos de FVIII y FXI los más prometedores.

Las condiciones en las que pueden darse al mismo tiempo fenómenos trombóticos venosos y arteriales son: la hiperhomocisteinemia y el síndrome antifosfolipídico, que se vincula con anticuerpos orientados hacia complejos de proteínas y fosfolípidos.

En segundo lugar, están los llamados estados hipercoagulables adquiridos, que se componen de un conjunto diverso de procesos en los que el riesgo de trombosis es más alto que el de la población general. Entre estos se incluyen la edad avanzada, el embarazo, la inmovilización, la intervención quirúrgica, las neoplasias, el uso de estrógenos, el síndrome nefrótico y los síndromes mieloproliferativos, así como la hemoglobinuria paroxística nocturna; todos ellos pueden presentar trombosis venosas y arteriales.

Tabla 3. Prevalencia estimada de factores protombóticos

	Población general
Deficit de antitrombina	0.1-0.3
Deficit de proteína C	0.2-0.5
Déficit de proteína S	0.2-0.5
Factor V Leiden	3-7
Hiperhomocisteinemia	2-6
Protombina	1-3
Niveles elevados del factor VIII	6-8

Tomado y adaptado de Espinosa G *et al* 2021

Algunos de los elementos trombóticos y sus efectos se describen a continuación.

5.5.1 Deficiencia de antitrombina

Se propaga de manera autosómica dominante y su prevalencia oscila entre el 0,02% en donantes saludables y entre el 0,5% y el 1% en grupos de pacientes con trombosis no seleccionados.

La transmisión es autosómica dominante y la forma homocigota no es compatible con la vida. Los pacientes afectados, por lo general, presentan trombosis antes de cumplir 25 años.

Es la modificación en la que aumenta el riesgo de que las personas afectadas desarrollen trombosis. Este déficit es responsable de menos del 1% de todos los fenómenos trombóticos.

5.5.2 Deficiencia de proteína C

Se ha vinculado la deficiencia heterocigota de proteína C con un incremento en el riesgo de trombosis. Su forma homocigota provoca serias trombosis en neonatos, y se transmite de manera autosómica dominante. En estos pacientes, la prevalencia de trombosis es del 3%, mientras que en la población general es solo del 0,2%. Todo esto resulta en un riesgo relativo de trombosis asociado a esta deficiencia de proteína C de 15. Este déficit es el causante de entre el 1 y el 2% de todos los episodios trombóticos.

5.5.3 Insuficiencia de proteína S

Desde 1984, se han registrado familias con este déficit. Su herencia es autosómica dominante y su prevalencia es parecida a la del déficit de proteína C. El mismo defecto genotípico puede dar lugar a variaciones fenotípicas como el tipo I (baja proteína S libre y baja proteína S total) o el tipo III (baja proteína S libre y normal en cuanto a la proteína S total).

Si además consideramos el impacto de las variables adquiridas (especialmente la edad), el espectro clínico de trombosis en este déficit es bastante amplio. Este déficit es la causa del 1% de todos los fenómenos trombóticos, según se ha informado.

5.5.4 Resistencia a la proteína C activada y al factor V de Leiden

Dahlbäck y colaboradores informaron en 1993 sobre tres pacientes con trombosis que tenían un defecto nuevo en la vía anticoagulante de la proteína C. Este fallo se presentaba como una reducción de la actividad anticoagulante del plasma frente a la proteína C activada o resistencia a esta misma proteína (RPCA). Un año después, el mismo escritor y Bertina determinaron que el 80% de los pacientes con RPCA tenían una mutación en el exón 10 del gen del factor V, la cual se conoce como factor V de Leiden.

La modificación G a A en el lugar 1.691 del gen que codifica el factor V51 es la mutación genética que causa más trombosis en la población caucásica.

La anomalía genética más común en pacientes con trombosis es esta, que se manifiesta en el 20% de ellos. En la población caucásica sana, su prevalencia oscila entre el 2 y el 15%. En la forma heterocigota, la existencia de la mutación está ligada a un aumento del riesgo de trombosis entre 3 y 8 veces; en la homocigota, el riesgo se eleva al menos 80 veces. La ausencia del factor V de Leiden no impide que se presente el estado de RPCA. En este caso, puede deberse a causas genéticas o adquiridas.

Entre las primeras se incluye el nuevo descubrimiento de otra mutación en el factor V (factor V de Cambridge), que incide en un punto adicional de acción de la proteína C sobre el factor V, mientras que factores adquiridos como los anticonceptivos orales, la presencia de un anticoagulante lúpico o el embarazo son causas de RPCA.

5.5.5 Alteración G20210A del gen de la protrombina

Tomado de Vayne C, Gruel Y, Pouplard C. Hemostasia: fisiología y principales pruebas de exploración, EMC - Tratado de Medicina 2021, 25(1), 1-10

Esta mutación, que fue descrita en 1996, es la segunda situación de riesgo trombótico más común y se encuentra en el 6% de los pacientes con trombosis. La función de la protrombina no se ve alterada por la mutación; más bien, se relaciona con una concentración plasmática mayor de esta. Se ha reportado un incremento de 2 a 5 veces en el riesgo trombótico asociado con su presencia, y su prevalencia es del 2% entre la población de raza blanca.

5.5.6 Hiperhomocisteinemia

Se relacionan con una mayor probabilidad de trombosis arterial y, de manera incierta, de trombosis venosa los niveles altos de homocisteína en plasma 60. La hiperhomocisteinemia puede surgir debido a factores genéticos o adquiridos, de modo que la mayoría de las personas con niveles elevados no tienen ninguna mutación genética; en cambio, muestran un deterioro del metabolismo de la metionina, que se origina por una ingesta alimentaria insuficiente de ácido fólico y vitaminas B6 o B12. Las mutaciones de la metilén-tetrahidrofolato reductasa o de la cistationina β -sintetasa son algunas de las variaciones genéticas más notables.

El polimorfismo C677T, que es común en esta última, se relaciona con la existencia de una enzima termolábil y niveles altos de homocisteína 64. Sin embargo, su rol como factor de riesgo trombótico es discutible.

5.5.7 Anticuerpos antifosfolipídicos

Los anticuerpos antifosfolipídicos, que pueden presentarse como anticuerpos anticardiolipina o anticoagulante lúpico, son un factor de riesgo trombótico adquirido y están asociados con la aparición tanto de trombosis venosa como arterial. El síndrome antifosfolipídico está compuesto por los abortos recurrentes y la trombocitopenia.

Hoy en día, se ha descubierto que estos anticuerpos se dirigen realmente hacia un conjunto de proteína y fosfolípido (o cofactor), del cual se han identificado la protrombina y la β 2-glucoproteína I. El anticuerpo lúpico podría estar presente en entre el 2 y el 14% de todas las trombosis.

5.5.8 Anomalías del fibrinógeno congénitas

Cerca del 12% de las llamadas disfibrinogenemias sufren episodios trombóticos, lo que ha llevado a describir casos severos de trombosis arterial o venosa en 34 familias; otras seis variantes mostraban al mismo tiempo hemorragias y trombosis.

Los procesos mencionados en estas anomalías implican un incremento en la resistencia de la fibrina a la lisis por parte de la plasmina o una anomalía en el t-PA que impide que este active al plasminógeno en presencia de fibrina. Anomalías congénitas del plasminógeno. Una familia japonesa con una tendencia trombótica severa fue diagnosticada con displasminogenemia en 1978.

Desde aquel entonces, se han reportado varias anomalías moleculares del plasminógeno, incluyendo un cambio en el centro activo y una activación defectuosa a plasmina, que están vinculadas con la trombosis venosa recurrente. En la mayoría de las ocasiones en que se identifica el defecto molecular, este implica reemplazar treonina por lisina en la posición 600. En otras situaciones, se trata de moléculas de plasminógeno que tienen una menor afinidad por sus activadores.

5.6 Indicadores del estudio de hipercoagulabilidad

Tomado de Espinosa G, Reverter JC. Coagulación y fibrinólisis plasmática. Estados de hipercoagulabilidad. Medicina Integral 2001, 38 (4), 156-166

5.6.1 Niveles altos de factor VIII. El FVIII tiene un papel de reactante en la fase aguda, y su procedencia se conoce solamente parcialmente. Puede haber una predisposición genética en los pacientes que tengan niveles plasmáticos constantemente altos a través del tiempo. En pacientes con trombosis venosa, la prevalencia de niveles altos de este factor es cercana al 15%, por lo que en el

futuro se incluirá su determinación, a todas luces, en el cribado rutinario de trombofilia.

5.6.2 Niveles altos del factor XI. Se asocia clínicamente el déficit de FXI con manifestaciones hemorrágicas. No se ha determinado de manera precisa su función en las trombosis humanas, aunque hay un estudio que establece una relación entre los niveles altos de FXI en el plasma y la aparición de trombosis venosas. Este análisis indica que el 11% de los casos de trombosis venosa en la población general se deben a niveles altos de FXI.

5.6.3 Indicaciones del estudio de hipercoagulabilidad. Hay una serie de señales que indican cuándo este estudio debe realizarse obligatoriamente. En estas situaciones, es un aspecto para considerar durante el estudio la existencia de antecedentes familiares de trombosis.

Se observan otras circunstancias en las que parece ser apropiado, como la trombosis idiopática y las que se presentan durante el embarazo, el puerperio y la etapa neonatal. Además, se incluyen las mujeres con abortos fetales reiterados, problemas severos de gestación y aquellas que sufren trombosis después del uso prolongado de anticonceptivos orales. Para prevenir el posible artefacto producido por reactantes de fase aguda sobre varios componentes hemostáticos, este estudio debe ser aplazado al menos 2 meses después de la aparición de la trombosis.

Asimismo, debe considerarse el posible impacto del tratamiento que se le haya proporcionado al paciente en el momento del estudio, dado que la heparina disminuye la actividad funcional de la antitrombina y los anticoagulantes orales reducen la concentración de las proteínas C y S73. Por lo tanto, siempre que sea factible, el estudio debe efectuarse después de que se haya terminado el

tratamiento anticoagulante y al menos tres semanas después de haberlo interrumpido.

La relevancia de estas investigaciones radica en que, al conocer una condición de hipercoagulabilidad, se puede determinar con mayor precisión la duración e intensidad del tratamiento anticoagulante (que puede ser indefinido), establecer el rango de anticoagulación necesario, advertir sobre el peligro de complicaciones (como la necrosis cutánea causada por cumarínicos en el déficit de proteína C), sugerir la necesidad o intensidad de las pautas profilácticas y, si se trata de familiares asintomáticos de personas con hipercoagulabilidad, es fundamental reconocer si existe el defecto para poder implementar pautas antitrombóticas en circunstancias riesgosas (Espinosa et al. 2001).

VI JUSTIFICACION

La enfermedad de von Willebrand es el trastorno hemorrágico hereditario más frecuente. Se caracteriza clínicamente por hemorragias mucocutáneas, como epistaxis y menorragia, y hemorragias prolongadas después de una cirugía o un traumatismo. El trastorno es consecuencia de un defecto en la agregación plaquetaria debido a defectos en la proteína del factor de Von Willebrand.

El factor de von Willebrand es una proteína grande y multimérica que desempeña un papel en la adhesión plaquetaria y también sirve como transportadora del factor VIII (F8). El F8 está mutado). En este tenor en este trabajo se describe algunos aspectos importantes de la enfermedad como una compilación académica organizada, basada en la compilación de información relacionada con la bioquímica de la coagulación plaquetaria siendo los principales documentos empleados para ello:

- Espinosa G, Reverter JC. Coagulación y fibrinólisis plasmática. Estados de hipercoagulabilidad. *Medicina Integral* 2001, 38 (4), 156-166
- Flores-Rivera OI, Ramírez-Morales K, Martín Meza-Márquez, JM, Nava-López JA, *Revista Mexicana de Anesteología* 2014, 37(2), S382-S386
- González-Villalva A, Bizarro-Neves P, Rojas-Lemus M, López-Valdez N, Ustarroz-Cano M, Barbosa-Barrón F, García-Gil B, Albarrán-Alonso JC, Fortoul van der Goes TI. El megacariocito: una célula muy original. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 2019, 62(1), 6-18.
- Vayne C, Gruel Y, Pouplard C. Hemostasia: fisiología y principales pruebas de exploración, EMC - Tratado de Medicina 2021, 25(1), 1-10

Así mismo se citan más de 50 artículos relacionados con la bioquímica de la enfermedad que se discuten en la parte de resultados de dicho trabajo siendo esta la principal aportación

VI RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

La enfermedad de Von Willebrand reporta actualmente 159 artículos en la base de datos del PubMed, desde 1978 a la fecha, lo que indica lo poco que se ha estudiado esta enfermedad, en este compendio discutimos algunos de los mas importante para determinar la genética y bioquímica de esta enfermedad

6.1 Clasificación de la enfermedad

La clasificación de la enfermedad de Von Willebrand tiene una larga y compleja historia. La clasificación actual se basa en la descrita por Sadler (1994) y actualizada por Sadler *et al.* (2006), que distingue tres subtipos principales según el fenotipo de la proteína mutante. Una clasificación anterior desarrollada por un grupo de trabajo de la Organización Europea de Investigación sobre la Trombosis fue proporcionada por Zimmerman y Ruggeri (1983) (Sadler *et al.* 2006)

Enfermedad de von Willebrand tipo 1

La VWD tipo 1 es una deficiencia parcial cuantitativa del VWF circulante. En este tipo de VWD, existe una relación normal de actividad funcional del VWF (VWF:RCo, actividad del cofactor de ristocetina) en relación con el nivel de antígeno del VWF (Sadler *et al.*, 2006, Goodeve, 2010). Mannucci (2004) afirmó que la VWD tipo 1 representa entre el 60 y el 80 % de todos los casos de VWD y se caracteriza por deficiencias cuantitativas leves a moderadas del VWF y del factor VIII, que se reducen de forma coordinada entre el 5 y el 30 % de los niveles plasmáticos normales (niveles patógenos de 5 a 30 UI/dl). En una declaración de consenso actualizada, Sadler *et al.* (2006) observaron que (1) algunos casos de VWF tipo 1 pueden tener patrones sutiles anormales de multímeros del VWF, pero aún conservan una actividad funcional normal, y (2) que otros loci distintos del VWF pueden ser responsables de algunos casos de VWD (Sadler *et al.* 2006)

En las revisiones, James y Lillicrap (2008) y Lillicrap (2009) afirmaron que el conocimiento de la patogenia y la base molecular de la enfermedad de von Willebrand tipo 1 aún están en sus inicios y sigue evolucionando. Los estudios de población han indicado que la enfermedad de von Willebrand tipo 1 es un rasgo genético complejo asociado con una variedad de factores genéticos y ambientales, y que es probable que estén involucrados otros loci además del VWF. Todavía existe incertidumbre sobre la patogenia de muchas variantes putativas del VWF identificadas, y la penetrancia incompleta y la expresividad variable de la enfermedad de tipo 1 contribuyen a la complejidad en el diagnóstico y la comprensión de la patogenia de la enfermedad. (Lillicrap et al. 2008-2009)

Enfermedad de von Willebrand tipo 2

El tipo 2 de VWD, que representa entre el 10 y el 30 % de los casos, se caracteriza por anomalías cualitativas del VWF; se divide además en los subtipos 2A, 2B, 2M y 2N. La proteína VWF mutante en los tipos 2A, 2B y 2M es defectuosa en su función dependiente de plaquetas, mientras que la proteína mutante en el tipo 2N es defectuosa en su capacidad para unirse a F8 (Mannucci, 2004; Goodeve, 2010; Sadler *et al.* 2006-2009)

Enfermedad de von Willebrand tipo 3

La enfermedad de von Willebrand tipo 3, que representa entre el 1 y el 5% de los casos, se caracteriza por un defecto cuantitativo grave del factor de von Willebrand en el plasma (menos del 1% de los niveles plasmáticos normales), con niveles bajos, pero habitualmente detectables de factor VIII (entre el 1 y el 10% de los niveles plasmáticos normales). En la enfermedad de tipo 3, que es poco frecuente (1 de cada 1 millón de personas), los síntomas son más frecuentes y graves (Mannucci, 2004, Sadler *et al.*, 2006).

6.2. Epidemiología de la enfermedad de Von Willenbrand

En 1926, Erik von Willebrand describió a una niña finlandesa de 5 años, procedente de las islas Aaland, con un trastorno hemorrágico, diferente a la hemofilia, de transmisión autosómica recesiva, con presencia de hemorragia mucocutánea, sin afectar articulaciones y un tiempo de hemorragia prolongado (Buga, 2014).

La enfermedad de von Willebrand es el trastorno hereditario de la coagulación más común en los seres humanos, presenta una distribución mundial y también es común en otras especies animales como perros y cerdos.

Su prevalencia varía dependiendo del enfoque que se tome para definir el diagnóstico. En por lo menos 2 grandes estudios prospectivos se ha encontrado que hasta el 1% de la población predominantemente pediátrica presenta síntomas y signos de laboratorio de enfermedad de von Willebrand.

Se cree que la prevalencia de la enfermedad de von Willebrand con síntomas hemorrágicos es de aproximadamente 1 por 1,000. En México no hay un registro epidemiológico de la enfermedad; solo se han informado algunos estudios desde el punto de vista clínico y hematológico, y recientemente un estudio piloto en 133 pacientes con sospecha de enfermedad de von Willebrand (Hernández-Zamora *et al.*, 2015)

La Enfermedad de von Willebrand (EvW) es el padecimiento hemorrágico hereditario más frecuente. Tiene una distribución mundial, sin predominio de raza ni sexo. Con una prevalencia global que va de 0.1 a 1% de la población general. La prevalencia de individuos sintomáticos es de alrededor de 1:10,000 (Ng C, 2015, James *et al.*, 2011). En el 2010, Bowman M *et al.*, reportan en edad pediátrica una prevalencia global de 5% y una prevalencia, de casos

sintomáticos, de cuando menos, de 1:1,000 habitantes (Bowman M, 2010). En México se desconoce la prevalencia de este padecimiento (Majluf-Cruz A, 2013). Los síntomas clínicos pueden presentarse a cualquier edad (Ng C, 2015).

En un estudio de Majluf et al, encontró en la población mexicana que la distribución de los tipos de FvW era similar a la reportada en la literatura mundial con 87 % para el tipo 1, 3% para tipo 3, y 7% para tipo 2, todos correspondientes al tipo 2-A. (Majluf-Cruz A, 2013). En los últimos 30 años se ha avanzado en el conocimiento de la estructura de la molécula del FvW, su mecanismo de producción y en el diagnóstico por laboratorio. Esta coagulopatía se caracteriza por manifestaciones hemorrágicas mucocutáneas asociadas a alteraciones cuantitativas o cualitativas del factor von Willebrand (FvW).

Este factor es una glucoproteína que se sintetiza en los megacariocitos y endotelio vascular y de ahí es liberado a la circulación. El gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 12.

Los monómeros de FvW contienen múltiples dominios que le proveen sus funciones hemostáticas, incluyendo los sitios de unión a plaquetas, dominios A1, C1 y C2, sitios de unión al colágeno en los dominios A1 y A3 y los sitios de unión al factor VIII (FVIII) en los dominios D' y D3.

El FvW tiene la capacidad de multimerizarse formando complejos que van de dímeros a multímeros. Los Multímeros de Alto Peso Molecular (MAPM), forma funcional de FvW más efectiva para la adhesión plaquetaria al sitio de la lesión vascular. El modulador biológico del FvW es la ADAMTS 13 (A Desintegrin And Metalloproteinase with TromboSpondin type 1 motif) quien puede romper al FvW en el dominio 2A. La ruptura de la gran molécula de multímeros de alto peso molecular conlleva a la producción de mutímeros de bajo peso molecular que son

hemostáticamente menos activos, lo cual es deseable fisiológicamente, ya que de producirse este fenómeno acarrearía la acumulación de MAPM que conllevaría a trombosis patológica como en la Púrpura Trombocitopénica Trombótica (PTT) (Ng C, 2015).

El defecto de la EvW puede ser cuantitativo o cualitativo; al primero corresponden los tipos 1 y 3 y al segundo el tipo 2, el cual se subdivide en 4 subtipos, A, B, M y N. En el primer grupo también se incluye el tipo 1C, donde no hay deficiencia en la producción del FvW, sino un aclaramiento acelerado del mismo.

En el tipo 1 la deficiencia del FvW va de leve a moderada; y en el tipo 3 la deficiencia es grave, este tipo representa la forma grave de la enfermedad. La herencia es autosómica y puede ser de carácter dominante o recesivo, los tipos 1, 2A, 2B y 2M se heredan de forma autosómico dominante y los tipos 2N y 3 la herencia es autosómica recesiva (Ng C, 2015, Branchford BR, 2012). La hemorragia clínica generalmente es leve en el tipo 1 y la gravedad incrementa en los tipos 2 y 3. Se considera que la gravedad de la hemorragia se correlaciona con los niveles de FVIII. Rara vez presentan hemorragias espontáneas aun en las deficiencias graves de FvW. El sitio más común de localización de las hemorragias son las mucosas; epistaxis, menorragias, gingivorragias En el tipo 3 las hemorragias suelen ser muy similares a las de la hemofilia moderada, con hemartrosis y hematomas (Castaman ,2013).

La EvW tipo 1 es la forma más frecuente del padecimiento, aunque su herencia es dominante, la penetrancia puede ser variable por lo que no todas las personas afectadas presentan el mismo rango de manifestaciones clínicas, aun dentro de una misma familia. Este fenómeno causa que se presente una gran dificultad en diagnosticar correctamente a este tipo (Branchford, 2012). La evolución y el pronóstico dependerán principalmente de un diagnóstico correcto para dar el tratamiento adecuado.

6.3 Características Clínicas

La EvW tipo 1 es el tipo más frecuente de enfermedad de von Willebrand. Sin embargo, los aspectos de laboratorio del diagnóstico se basan en ensayos fenotípicos del VWF que tienen una relación incierta con la función del VWF in vivo y con el sangrado clínico.

La EvW tipo 1 se caracteriza por reducciones leves a moderadas de los niveles plasmáticos de VWF, que pueden variar con el tiempo, y los niveles plasmáticos de VWF varían ampliamente en la población normal, desde menos de 50 U/dl hasta aproximadamente 200 U/dl.

El diagnóstico molecular del tipo 1 es poco conocido. Todos estos factores hacen que el diagnóstico definitivo de la EvW tipo 1 sea particularmente difícil (O'Brien *et al.*, 2003; Cumming *et al.*, 2006).

O'Brien *et al.*, 2003) informaron 12 probados, 10 canadienses y 2 del Reino Unido, con un diagnóstico clínico de VWD tipo 1. Todos tenían antecedentes de sangrado con epistaxis, menorragia, hematomas con facilidad y sangrado excesivo de heridas, especialmente después de cirugías y procedimientos dentales.

Los estudios de laboratorio mostraron que todos tenían multímeros de VWF de varios tamaños, pero con una intensidad reducida, consistente con un defecto cuantitativo en VWD tipo 1. Las pruebas para VWF:Ag (niveles de antígeno proteico VWF) y VWF:RCO (función de agregación inducida por plaquetas de VWF con ristocetina) mostraron niveles disminuidos de ambos en comparación con lo normal, y FVIII:C (actividad procoagulante del factor 8) fue normal en todos excepto 1 paciente (O'Brien *et al.*, 2003)

Cabe destacar que todos excepto 1 tenían tipo O del grupo sanguíneo ABO. Se encontró que todos los pacientes tenían la misma mutación heterocigótica en el gen VWF (Y1584C) (Cumming et al.,2006)

Se examinaron 40 familias del Reino Unido con un diagnóstico clínico de VWD tipo 1. Después de la revisión, se encontró que 6 tenían VWD tipo 2 y 2 familias adicionales no tenían VWD. El análisis genético identificó 6 mutaciones patógenas del VWF en 9 (28%) de las 32 familias restantes con VWD tipo 1. Tres casos índices (9%) tenían más de 1 mutación candidata. Quince (47%) familias no tenían mutación identificada. Cumming et al. ,2006) identificaron el cambio Y1584C en 8 (25%) familias, pero la variante se segregó con la enfermedad en solo 3 familias, no se segregó en 3 familias y arrojó resultados equívocos en 2 familias, lo que sugiere que es un polimorfismo común que aumenta la susceptibilidad a la enfermedad, pero no causa la enfermedad por sí mismo. (Cumming *et al.* ,2006). Los autores concluyeron que la detección de mutaciones en el gen VWF tiene una utilidad general limitada en el diagnóstico genético y los estudios familiares en la VWD tipo 1 debido a la penetrancia incompleta y la expresividad variable.

Goodeve *et al.*, (2007) identificaron mutaciones del VWF en 105 (70%) de 150 pacientes índice de 9 países europeos con un diagnóstico clínico de VWD tipo 1. Se identificaron un total de 123 mutaciones candidatas del VWF, incluidas 53 mutaciones nuevas: 88 pacientes tenían 1 mutación, 16 tenían 2 y 1 tenía 3. Sin embargo, el análisis de multímeros mostró que una parte sustancial de la cohorte (38%, 57 de 150) tenía un patrón de multímeros anormal que no encajaba en los criterios aceptados para VWD tipo 1. Además, 18 pacientes tenían una unión reducida de F8 al VWF, incluidos 3 con una unión marcadamente reducida consistente con VWD tipo 2N. Cincuenta y un probados con multímeros normales tenían una mutación del VWF, y 42 con multímeros normales no tenían mutaciones identificables del VWF, lo que indica heterogeneidad genética. Se observó segregación incompleta en muchas de las familias con mutaciones.

James et al. (2007) examinaron a 123 familias canadienses con un diagnóstico clínico de VWD tipo 1. Todos los pacientes tenían sangrado mucocutáneo excesivo, incluyendo menorragia, hematomas con facilidad, epistaxis, sangrado posterior a procedimientos dentales y sangrado posoperatorio. El nivel medio de VWF:Ag para los casos índice fue de 0,36 UI/ml, el nivel medio de VWF:RCo fue de 0,34 UI/ml y el nivel medio de FVIII fue de 0,54 UI/ml. El patrón de multímeros de VWF fue normal. La mayoría de los casos índice (77, o 62%) eran del grupo sanguíneo O. Se encontraron supuestas mutaciones de VWF en 78 pacientes (63%), dejando al 37% sin cambios identificados. Los cambios comprendían 50 variantes diferentes: 31 (62%) mutaciones sin sentido, 8 (16%) cambios que involucraban la región reguladora de la transcripción del VWF, 5 (10%) pequeñas delecciones/inserciones, 5 (10%) mutaciones del sitio de empalme y 1 mutación sin sentido. Veintiuno de los casos índice tenían más de una supuesta mutación del VWF, aunque muchos de estos cambios genéticos pueden haber sido polimorfismos. (James et al. 2007) observaron que las variaciones de secuencia dentro del gen VWF claramente no eran los únicos determinantes genéticos del fenotipo de VWD tipo 1 en algunos casos. Además, la contribución relativa de la variación de la secuencia del VWF parecía ser más importante en los individuos más gravemente afectados, y la contribución de factores como el grupo sanguíneo ABO se volvió más significativa en los casos más leves. Los hallazgos indicaron que los casos más graves de VWD tipo 1 tienden a tener mutaciones dentro del gen VWF que son altamente hereditarias.

Por el contrario, los casos más leves, en los que la heredabilidad es variable, tienen determinantes genéticos más complejos y es más probable que haya contribuciones de otros factores genéticos, como el grupo sanguíneo ABO, así como posiblemente factores ambientales (Mannucci, 2004; Sadler et al.2006; Goodeve).

6.4 Mutaciones Asociadas a la Enfermedad

6.4.1 Generalidades

Goodeve (2010) señaló que las mutaciones en el gen VWF, que a veces se numeraban a partir del sitio de inicio de la transcripción de la proteína madura, ahora están "numeradas a partir de la primera A del codón iniciador de metionina ATG (A = +1) al inicio de cada proteína (Met = +1), utilizándose habitualmente como secuencia de referencia ADNc en lugar de ADN genómico.' Por tanto, la mutación originalmente denominada ARG545CYS ahora se denomina ARG1308CYS (R1308C) (Goodeve 2010)

6.4.2 Descripción del Gen VWF

El gen VWF codifica el factor von Willebrand (VWF), una gran glicoproteína multimérica que desempeña un papel central en el sistema de coagulación sanguínea, sirviendo como mediador importante de la interacción plaquetas-pared de los vasos y de la adhesión plaquetaria, y como portador del factor VIII de coagulación.

La actividad disminuida o anormal del VWF da como resultado la enfermedad de von Willebrand (VWD) un trastorno hemorrágico hereditario común y complejo (Ginsburg et al. 1985). El receptor del factor von Willebrand es un gran complejo que comprende 4 proteínas: glicoproteína Ib (GP1BA; GP1BB;), glicoproteína IX plaquetaria (GP9) y glicoproteína V plaquetaria (GP5).

Ginsburg *et al.*, (1985) aislaron clones de ADNc superpuestos correspondientes al gen del VWF humano. La transcripción de 8,2 kb representó aproximadamente el 0,3% del ARNm de células endoteliales, pero fue indetectable en varios otros tejidos examinados. Sadler et al. (1985) aislaron clones de ADNc de células endoteliales de vena umbilical humana cultivadas. Se identificaron dos insertos que juntos codificaban aproximadamente el 80% de la proteína. Uno

correspondía a los residuos 1 a 110 de la proteína madura circulante y el segundo codificaba 1.525 residuos en el extremo C terminal; Había una brecha de aproximadamente 350 residuos entre los dos clones. Al menos tres segmentos polipeptídicos separados mostraron evidencia de duplicación interna, lo que sugiere una historia evolutiva compleja. La proteína madura de longitud completa contiene 2050 aminoácidos (Titani *et al.*, 1986).

Es importante mencionar que VWF se sintetiza en células endoteliales y megacariocitos como una preproteína de 2.813 residuos la cual forma un dímero y sufre una extensa modificación postraducciona y se empaqueta como una proteína madura en cuerpos de Weibel-Palade de células endoteliales y gránulos alfa de plaquetas. Las células endoteliales secretan VWF de manera constitutiva, mientras que las plaquetas liberan VWF cuando se estimulan.

Los multímeros de VWF circulantes están compuestos por hasta 40 subunidades y su tamaño varía de 500 a 10 000 kD (revisión de Goodeve, 2010). El VWF se sintetiza en megacariocitos y células endoteliales con un péptido señal de 22 aminoácidos, un propéptido de 741 aminoácidos y un VWF maduro de 2050 aminoácidos (Goodeve, 2010).

6.4.3 Descripción de la estructura genética de VWF

Mancuso *et al.* (1989) concluyeron que el gen VWF tiene aproximadamente 178 kb de largo y contiene 52 exones. Los exones varían de 40 a 1379 pb y los intrones de 97 pb a aproximadamente 19,9 kb. El péptido señal y el propéptido (antígeno II de von Willebrand) están codificados por 17 exones en aproximadamente 80 kb de ADN, mientras que la subunidad madura del factor von Willebrand y la región no codificante 3-prima están codificados por 35 exones en el resto del gen. Se identificaron varias secuencias repetitivas, incluidas 14 repeticiones Alu y una repetición simple polimórfica TCTA de aproximadamente 670 pb en el intrón 40.

Las regiones del gen que codifican dominios homólogos tienen estructuras similares, lo que respalda un modelo para su origen mediante duplicación de segmentos genéticos. (Mancuso et al. 1989). A partir de un estudio de una serie de clones genómicos cósmidos superpuestos de VWF, Collins *et al.* (1987) identificaron el sitio de inicio de la transcripción, una porción de la región promotora y el codón de terminación de la traducción. Sus pruebas respaldaron la existencia de un único gen del VWF en el genoma haploide

6.4.4 Datos e historia del mapeo del gen

Verweij et al. (1985) clonaron el gen del VWF y lo asignaron al cromosoma 12 utilizando sondas de ADNc con paneles de células híbridas humanas y de roedores (Verweij et al. 1985) Mediante hibridación de células somáticas e hibridación in situ utilizando un clon de ADNc del gen, asignaron el gen VWF a 12pter-p12 (Ginsburg et al. 1985)

Shelton-Inloes *et al.* (1987) confirmaron la localización del gen en el cromosoma 12 e identificaron una secuencia homóloga en el cromosoma 22. El gen VWF es el gen mapeado más distalmente en 12p13.3 (NIH/CEPH Collaborative Mapping Group, 1992) (Shelton-Inloes et al. 1987)

Barrow *et al.*, (1993) demostraron que los loci para la neurotrofina-3 (NTF3) y el factor von Willebrand se asignan a 12p13 en el ser humano y están estrechamente vinculados en el cromosoma 6 de la función genética (Barrow *et al.*, 1993)

Sporn *et al.* (1987) descubrieron que el VWF liberado de los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales se unía con especial avidez a la matriz extracelular (Sporn *et al.* 1987)

Wagner *et al.*, (1991) demostraron que el propolipéptido VWF es necesario para la formación de los gránulos de almacenamiento de Weibel-Palade. Después de la estimulación del secretagogo, los cuerpos de Weibel-Palade se someten a exocitosis y liberan largos filamentos de VWF, con un promedio de 100 micrómetros, que capturan plaquetas a lo largo de su longitud (Wagner *et al.*, 1991). La posterior activación y agregación de plaquetas provoca la formación de un tapón hemostático (Michaux *et al.*, 2006). Michaux *et al.* (2006) determinaron que el propéptido del VWF, que se libera en el torrente sanguíneo durante la exocitosis, participaba en una interacción dependiente del pH con los tres primeros dominios de la proteína madura del VWF y esta interacción era necesaria para el almacenamiento compacto de los filamentos del VWF. Demostraron que la multimerización y el almacenamiento tubular eran un requisito previo para el rápido despliegue de largos filamentos de VWF en células endoteliales de la vena umbilical humana estimuladas en cultivo y en vénulas cremaster dañadas por láser en ratones. Si los túbulos se desmontaban antes de la exocitosis, se liberaban filamentos cortos o enredados y se reducía el reclutamiento de plaquetas. Michaux *et al.* (2006) concluyeron que la compactación del VWF en túbulos determina la forma de varilla de los cuerpos de Weibel-Palade y es fundamental para la función hemostática de la proteína (Michaux *et al.* 2006)

ADAMTS13 (604134) escinde específicamente un enlace peptídico entre tyr1605 y met1606 en el dominio A2 del VWF y, por lo tanto, actúa para regular el tamaño del VWF. Kokame *et al.* (2004) identificaron un péptido de 73 aminoácidos, al que denominaron VWF73, como el sustrato mínimo de VWF escindible por ADAMTS13. VWF73 contiene asp1596 a arg1668 de VWF (Kokame *et al.* 2004).

Wu *et al.* (2006) escindieron el VWF73 en péptidos más cortos y descubrieron que un péptido de 24 aminoácidos que abarcaba de pro1645 a lys1668 era el péptido más corto que podía unirse a ADAMTS13 e inhibir competitivamente su escisión de un sustrato derivado del VWF. Este péptido y los péptidos más largos

que contienen esta secuencia central también inhibieron la escisión del VWF multimérico por parte de ADAMTS13. Estos resultados sugirieron la presencia de un sitio de unión extendida complementaria, o exosito, en ADAMTS13.

Las mutaciones Asp1653-to-ala y asp1663-to-ala en el sustrato derivado del VWF redujeron significativamente la tasa de escisión del péptido sustrato por ADAMTS13, mientras que una mutación glu1655-to-ala mejoró significativamente la tasa de escisión. Wu et al. (2006) concluyeron que las interacciones iónicas entre el exosito de ADAMTS13 y una región del VWF que abarca desde pro1645 hasta lys1668 desempeñan un papel importante en el reconocimiento del sustrato (Wu et al. 2006)

Cao et al. (2008) demostraron que, bajo estrés cortante y a pH fisiológico y fuerza iónica, el factor de coagulación VIII (F8; 300841) aceleró, en un factor de aproximadamente 10, la tasa de escisión mediada por ADAMTS13 del enlace tyr1605/met1606 en el VWF. El análisis de multímeros reveló que el factor VIII aceleró preferentemente la escisión de multímeros de alto peso molecular (HMW) (Cao et al. 2008)

La capacidad del factor VIII para mejorar la escisión del FvW mediante ADAMTS13 se perdió rápidamente después del tratamiento previo del factor VIII con trombina (F2; 176930). Cao et al. (2008) concluyeron que el factor VIII regula el procesamiento proteolítico del FvW por parte de ADAMTS13 bajo estrés cortante, que depende de la interacción de alta afinidad entre el factor VIII y el FvW. Utilizando variantes recombinantes de ADAMTS13 y VWF para análisis cinético, Gao et al. (2008) determinaron que los segmentos entre gln1624 y arg1668 en el dominio VWF A2 interactuaban con el primer dominio de trombospondina-1 (ver 188060), el dominio rico en cys y el dominio espaciador de ADAMTS13. Las interacciones individuales fueron relativamente débiles, pero juntas aumentaron la tasa de escisión del sustrato. La eliminación interna de

gln1624 a arg1641 en el dominio VWF A2 no afectó la tasa de escisión, pero las eliminaciones breves en ambos lados del sitio de escisión tyr1605-met1606 abolieron la escisión. La adición de residuos N-terminal a glu1554 en VWF redujo la tasa de escisión de VWF por ADAMTS13 (Gao *et al.*, 2008)

6.4.5 Características bioquímicas Estructura cristalina

Zhou *et al.*, (2011) determinaron la estructura cristalina de un dominio VWF A2 diseñado. La estructura contenía un sitio de unión de Ca(2+) en la región (residuos 1591 a 1602) que conectaba alfa-3 con beta-4.

Huizinga *et al.*, (2002) presentaron la estructura cristalina del dominio amino terminal de la glicoproteína 1B-alfa (GP1BA; 606672) del receptor plaquetario y su complejo con el dominio A1 del VWF. En el complejo, GP1BA envuelve un lado de A1, proporcionando 2 áreas de contacto unidas por un área de interacción de carga solvatada. Las estructuras explican los efectos de las mutaciones de ganancia de función relacionadas con los trastornos hemorrágicos y proporcionan un modelo para la activación inducida por cizallamiento (Huizinga *et al.* 2002)

La mutación de asp1596 o asn1602 afectó la capacidad del dominio A2 para unirse a Ca(2+). La unión de Ca(2+) estabilizó el dominio A2 e impidió su despliegue, protegiéndolo así de la escisión por ADAMTS13. La unión del ligando se apoya y coordina mediante adaptaciones estructurales únicas en los dominios que constituyen el VWF.

El factor von Willebrand (VWF) se encuentra entre las proteínas más grandes que circulan en el plasma. Aunque se reconoce que participa en procesos como la inflamación, la angiogénesis y la metástasis del cáncer, el VWF es predominantemente conocido por su papel en la hemostasia.¹⁻³ De hecho, su

deficiencia o disfunción se asocia con complicaciones hemorrágicas en un trastorno conocido como enfermedad de von Willebrand (EVW). 4 el VWF se sintetiza como un polipéptido monocatenario con una estructura de dominio distinta: D1-D2-D'D3- A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK (donde CK se refiere a dominio del nudo de cisteína; Figura 1).⁵ El procesamiento postraducciona l incluye la eliminación de la región D1-D2 (también conocida como propéptido VWF) y la generación de multímeros de tamaño heterogéneo mediante la formación de puentes disulfuro intermoleculares en el Dominio CK C-terminal y región D'D3 N-terminal.

El factor Von Willebrand (VWF) se une a múltiples proteínas, cuyas interacciones se regulan de manera diferente para cada uno de estos ligandos. En cuanto a su papel en la hemostasia, el VWF necesitará interactuar con varios ligandos, incluido el factor de coagulación VIII (FVIII), la glicoproteína del receptor de plaquetas Iba (Gplba), la proteasa que escinde el VWF ADAMTS13, el colágeno subendotelial y la integrina α IIb β 3.

Es importante destacar que la interacción con cada uno de estos ligandos se regula de una manera diferente. Por ejemplo, mientras que el VWF debería unirse al FVIII con alta afinidad en la circulación, debe evitar interactuar con la Gplba hasta que el reclutamiento de plaquetas se vuelva relevante.

La belleza de la molécula del VWF es que las claves para desbloquear diferentes niveles de regulación están directamente presentes en su estructura. A primera vista, los dominios que componen el VWF no son únicos, ya que el plegamiento general de los dominios A, C, CK y D se puede encontrar en muchas proteínas de organismos pro y eucariotas. Sin embargo, se han incorporado varios ajustes distintos en la estructura del VWF para cumplir con los requisitos necesarios con respecto a las interacciones específicas del ligando. La adaptación más “famosa” es el tamaño inusualmente grande del VWF. Su gran tamaño hace que el VWF

sea susceptible a cambios conformacionales bajo la influencia de fuerzas hidrodinámicas, que es un mecanismo para controlar la función del VWF.

Al revisar los estudios estructurales del VWF realizados durante las últimas dos décadas, los secretos de esta fascinante molécula se han ido desvelando poco a poco, ayudándonos a reconocer cómo se regula la complejación entre el VWF y sus ligandos. Por lo tanto, en esta revisión, nos concentraremos en los principales ligandos del VWF y discutiremos cómo dilucidar las estructuras tridimensionales de los dominios del VWF, generalmente en complejo con sus ligandos, ha contribuido a nuestra comprensión de cómo se controla la función del VWF. Además, estos conocimientos también mejoraron nuestro conocimiento sobre por qué ciertas mutaciones están asociadas con la disfunción del FvW y las tendencias hemorrágicas posteriores (Matsumoto y Harada 2022).

6.4.5.1 Unión del FVIII a la región D'D3.

El VWF contiene cuatro conjuntos D completos y otro parcial, que en conjunto abarcan cerca del 60% del contenido total de aminoácidos. Una mirada más cercana a estos conjuntos D ha revelado la presencia de cuatro estructuras distintas: un dominio D de von Willebrand (VWD), una estructura C8, una estructura similar a un inhibidor de tripsina (TIL) y un módulo E.5 Estos Las estructuras se pueden encontrar en los conjuntos D1, D2, D3 y D4, mientras que el segmento D' contiene solo la estructura TIL y el módulo E. Dos de los conjuntos D, es decir, la región D'D3 (residuos Ser764-Thr1233), están ubicados en el extremo N-terminal de la subunidad madura y contribuyen al proceso de multimerización formando enlaces de cisteína entre subunidades con una región D'D3. de otra molécula de VWF.5,9-11 Además de su papel en la multimerización de VWF, la región D'D3 también es crítica para la interacción entre el FvW y el FVIII.12 El FvW es una proteína chaperona necesaria para el FVIII, que lo protege de una rápida eliminación y degradación proteolítica (Hernández-Zamora *et al.*, 2015)

De hecho, la ausencia de VWF se asocia con niveles de FVIII fuertemente reducidos.¹³ La expresión de la porción dimérica D'D3 en ratones con deficiencia de VWF normalizó completamente los niveles de FVIII, lo que demuestra que esta región alberga toda la información para unirse al FVIII.¹⁴ En particular, la afinidad de la interacción FVIII/VWF es inusualmente alta ($KD \approx 0,5$ nM), lo que permite que >95 % del FVIII circule en forma de complejo con el FVW.

Aunque los estudios de mutagénesis clásicos identificaron aminoácidos implicados en la unión del FVIII¹⁸⁻²¹, la disponibilidad de estructuras de FVIII y VWF ha proporcionado información detallada sobre su interacción.

Primero, en dos publicaciones consecutivas, Chiu et al. y Yee et al. utilizaron microscopía electrónica de partícula única y tinción negativa para generar imágenes de baja resolución del complejo entre FVIII y D'D3.^{22,23} Demostraron que la cadena ligera de FVIII ($\alpha 3$ -A3-C1-C2) está envuelta por la cadena ligera de FVIII ($\alpha 3$ -A3-C1-C2) 'Región D3, con el conjunto D3 interactuando con los dominios C1- C2 y el segmento D' uniéndose a la porción $\alpha 3$ -A3 (Krishnaswamy 2015).

Otro estudio confirmó la relevancia del segmento D' en la unión del FVIII y utilizó espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno-deuterio y análisis mutacional para identificar el segmento D' Arg782-Cys799 como parte de la interfaz de unión del FVIII.²⁴

Por otra parte, el complejo D'D3/FVIII se obtuvo utilizando una proteína de fusión FVIII-D'D3, denominada BIVV001 (ahora rebautizada como efanesoctocog alfa).²⁵ Combinando microscopía crioelectrónica y estructuras existentes de FVIII y la región D'D3, se obtuvo una imagen de alta resolución. (2,9 Å) se generó visualización del complejo D'D3/FVIII. Las subestructuras de D'D3 son

distinguibles, con el C8-3 uniéndose a la parte inferior del dominio C2 de FVIII y el dominio VWD-3 al dominio C1 de FVIII. Además, la estructura TIL' interactúa con los dominios C1 y A3 del FVIII, incluida la región ácida a3. Más específicamente, los residuos ácidos de FVIII Asp1676, Asp1678 y Asp1681 interactúan con los residuos de TIL' Arg820, Arg826 y Arg768, respectivamente, mientras que el residuo de FVIII sulfatado Tyr1680 interactúa directamente con el residuo de TIL' Arg816.

La estructura detallada del complejo D'D3/FVIII explica muchas de las mutaciones que alteran la unión del FVIII. Por ejemplo, las mutaciones dentro del VWF en la región Arg782-Cys799 y en Arg816 reducen la unión del FVIII y son conocidas por su asociación con la EVW tipo 2N.

Una cuestión relevante es si la unión del FVIII depende de la multimerización. El VWF dimérico, que es la única especie natural de VWF que carece de extremos N dimerizados, tiene una afinidad cinco veces menor por el FVIII en comparación con el VWF multimérico. Esto sugiere que el enlace covalente entre los extremos N del VWF mejora la unión del FVIII. Dado que los estudios de unión de VWF-FVIII que compararon preparaciones enriquecidas en multímeros de bajo y alto peso molecular identificaron afinidades similares por el FVIII, la multimerización adicional no parece mejorar aún más la unión de FVIII.¹⁶ De hecho, la relación FVIII/VWF permanece relativamente sin cambios en pacientes caracterizados por una pérdida de multímeros de alto peso molecular. Unión de Gplb α al dominio A1 Adyacente a la región D'D3 se encuentra el dominio A1 (residuos Tyr1271-Asp1459), con los extremos N y C conectados por un puente disulfuro (Cys1272-Cys1458). Este dominio comparte semejanza estructural con los dominios A2 y A3 en un pliegue von Willebrand A (VWA) que está ampliamente extendido entre familias de proteínas en eucariotas y procariotas. La estructura general consiste en láminas β hidrófobas centrales flanqueadas por α -hélices anfipáticas, formando un pliegue tipo Rossmann. El dominio A1 media la unión del FvW al receptor de plaquetas Gplb α , y su estructura cristalina se esclareció en la década

de 1990.

La resolución de la estructura del complejo VWF/GpIb α se vio dificultada porque ambas proteínas no interactúan espontáneamente, ya que su asociación depende de la fuerza de corte. Sin embargo, al utilizar fragmentos que contienen mutaciones de ganancia de función que facilitan la complejación, Huizinga *et al.*, 2022. resolvieron la estructura del dominio A1 unido al dominio N-terminal de GpIb α . Desde entonces, se han producido estructuras adicionales de complejos VWF/GpIb α utilizando variantes de tipo salvaje y otras variantes de ganancia de función. El complejo VWF/GpIb α involucra dos sitios interactivos principales, uno que contiene la hélice $\alpha 3$ de dominio A1, bucle $\alpha 3\beta 4$ y cadena $\beta 3$ (sitio interactivo 1) y un segundo que contiene bucles de dominio A1 $\alpha 1\beta 2$, $\beta 3\alpha 2$ y $\alpha 3\beta 4$, ubicado en la cara inferior del dominio A1 (sitio interactivo 2). La estructura del complejo reveló información sobre cómo las diferentes mutaciones afectan la unión entre ambas proteínas. Primero, se encuentran mutaciones en el dominio A1 o en GpIb α que resultan en una pérdida de función (asociada con VWD tipo 2M o síndrome de Bernard-Soulier, respectivamente) dentro de los respectivos sitios interactivos. Segundo, ganancia de Se encontraron mutaciones funcionales en GpIb α que se sabe que provocan VWD de tipo plaquetario dentro de una conformación única de horquilla β de 16 residuos que penetra en el sitio interactivo 1 del dominio A1.

En el estado libre, esta región adopta un estado desordenado o de hélice α , mientras que la estructura de horquilla β se ve favorecida para la unión del VWF. Las mutaciones en esta región (p. ej., Met239Val) estabilizan la estructura de horquilla β , provocando una unión espontánea. de GpIb α al FvW. Sorprendentemente, ninguna de las mutaciones de ganancia de función dentro del dominio A1 asociadas con la VWD tipo 2B se localiza dentro de ninguno de los sitios interactivos, lo que sugiere que otras regiones dentro del dominio A1 están involucradas en la regulación de la unión de GpIb α . Se obtuvo información sobre el mecanismo subyacente cuando se compararon fragmentos recombinantes del dominio A1 con péptidos flanqueantes de diferentes tamaños para determinar la

unión de Gplb α .^{39,40} Cuanto más corto sea el péptido flanqueante, más eficientemente el dominio A1 se une a Gplb α . Li y sus colegas desentrañaron la base molecular mediante la cual los péptidos flanqueantes controlan las interacciones A1-Gplb α . Demostraron que los residuos Gln1238-His1268 en el extremo N del dominio A1 interactúan directamente con los residuos Leu1460-Asp1472 en el extremo N-terminal del dominio A1. Extremo C del dominio A1.

Esta estructura se conoce como módulo autoinhibidor (AIM) y bloquea el acceso de Gplb α al sitio interactivo 2 en la parte inferior del dominio A1.^{41,42} Bajo la presión de fuerzas hidrodinámicas, los péptidos AIM se disocian, exponiendo así Sitio interactivo 2 con Gplb α (Figura 9A-B).⁴³ Es de destacar que se sabe que la ristocetina, un antibiótico que induce la unión de VWF/Gplb α , interactúa con los péptidos Cys1237-Pro1251 y Glu1463-Asp1472, ambos contenidos en el AIM.

Parece concebible que la ristocetina desestabilice la estructura AIM para inducir la unión de Gplb α . Es importante destacar que las mutaciones que se sabe que están asociadas con la EVW tipo 2B generalmente se ubican dentro o cerca del AIM e interrumpen la interacción entre ambos péptidos, lo que proporciona una explicación de la unión espontánea de estos mutantes a Gplb α .

En conjunto, estos estudios muestran que los cambios conformacionales en el entorno inmediato del dominio A1 controlan sus interacciones con Gplb α . Curiosamente, se han descrito varios nanocuerpos que respaldan esta idea. Primero, Hulstein y sus colegas describieron un nanocuerpo dirigido al dominio A1, llamado AU-VWFA-11, que solo se une al VWF en una conformación de unión a Gplb α .⁴⁵ Este nanocuerpo se ha utilizado para determinar la conformación activa del VWF en un espectro de enfermedades.

Otro ejemplo es caplacizumab, un nanocuerpo bivalente que inhibe las interacciones VWF-Gplb α y está aprobado para el tratamiento de la púrpura trombótica trombocitopénica. Se utilizó una variante monovalente de caplacizumab (denominada VHH81) para producir un cocrystal con el A1- dominio. VHH81 se une y estabiliza la estructura AIM, evitando así su disociación bajo tensión de corte.

Como tal, se inhibe la exposición del sitio interactivo 2 y la posterior unión de Gplb α .⁴² Otro nanocuerpo denominado 6D12 también se une al AIM pero tiene el efecto opuesto al caplacizumab: 6D12 promueve la disociación de los péptidos AIM, convirtiendo el VWF en un Gplb activo. conformación de unión α . Apparently, los nanocuerpos son herramientas valiosas para monitorear los cambios conformacionales en general y en el VWF en particular, y se discutirá otro ejemplo al abordar el dominio A3 del VWF.

Sabiendo que se necesitan fuerzas de corte para desbloquear los sitios interactivos con Gplb α , surge la pregunta de si este proceso depende del multímero. En la década de 1980, Chopek et al. demostró que la unión de Gplb α - depende estrictamente del tamaño del multímero, en el sentido de que los multímeros de bajo peso molecular son demasiado pequeños para soportar la adhesión plaquetaria dependiente de Gplb α .

Este efecto es particularmente visible en pacientes que presentan problemas de multimerización y complicaciones hemorrágicas asociadas (EvW- tipo 2A). Se supone que el despliegue del VWF depende del tamaño, siendo los multímeros más grandes más sensibles a las fuerzas hidrodinámicas que los multímeros más pequeños (Xianchi Dong, et al. 2019)

6.4.5.2 Unión ADAMTS13 al dominio A2

El dominio A2 (residuos Arg1492-Ser1671) desempeña un papel específico en la regulación de la función del VWF y el tamaño del multímero. Estructuralmente, el dominio A2 se diferencia de otros dominios VWA por carecer del puente disulfuro que conecta los extremos N y C-terminales del dominio.

Esto permite que el dominio A2 tenga una estructura más flexible y adapte su conformación cuando se expone a las fuerzas hidrodinámicas, una capacidad necesaria sabiendo que la regulación proteolítica del tamaño multimérico del VWF se produce mediante la hidrólisis del enlace peptídico Tyr1605-Met1606 por la metaloproteasa ADAMTS13.

La estructura cristalina del dominio A2 reveló una serie de diferencias relevantes en comparación con otros miembros de la familia VWA. En primer lugar, la hélice $\alpha 4$ central está ausente en el dominio A2 y está reemplazada por un bucle. carece de estructura secundaria (denominada bucle sin $\alpha 4$) que está aproximadamente a 6 Å del sitio de escisión de ADAMTS13.

En segundo lugar, el dominio A2 contiene un enlace disulfuro vecinal único entre los residuos Cys1669-Cys1670. En tercer lugar, está presente un sitio de unión de Ca^{2+} distintivo, coordinado por residuos en la hoja $\beta 1$ (Asp1498), la hélice $\alpha 3$ (Asp1596, Arg1597) y el bucle $\alpha 3\beta 4$ (Ala1600, Asn1602) (Figura 9A). Finalmente, un residuo cis-Pro inusual está presente en la posición 1645 (Figura4A). Cada una de estas características parece ser una adaptación funcional que regula la exposición del sitio de escisión Tyr1605-Met1606.

Con respecto al bucle sin $\alpha 4$, reduce el acceso de ADAMTS13 al enlace escindible en el estado plegado, mientras que su naturaleza flexible le permite alejarse rápidamente de Tyr1605-Met1606 durante el despliegue del dominio A2.

Simultáneamente, este bucle se replegará sobre la hebra $\beta 4$ menos rápidamente que cuando habría sido una estructura de hélice α , dejando tiempo suficiente para que ADAMTS13 escinda su objetivo.

También se sospecha que cis-Pro1645 retrasa el replegamiento del dominio A2. El enlace disulfuro vecinal agrega rigidez al extremo C-terminal del dominio A2, aumentando la barrera energética para que se despliegue el dominio.

De manera similar, el sitio Ca^{2+} contribuye a la estabilidad de la estructura de dominio A2, lo que resulta en una mayor resistencia al despliegue. La eliminación del sitio de unión de Ca^{2+} o el puente disulfuro vecinal provoca un despliegue prematuro y una mayor sensibilidad a la proteólisis por ADAMTS13.^{52,53} Por el contrario, la introducción de una conexión covalente artificial entre las hojas $\beta 1$ y $\beta 2$ perjudican el despliegue y previenen la proteólisis mediada por ADAMTS13.

Una vez desplegado, el dominio A2 contiene un sitio interactivo extendido para varios dominios contenidos en ADAMTS13. De hecho, la interfaz de interacción completa se extiende más allá del dominio A2 y también involucra regiones dentro del fragmento D4-CK de VWF⁵⁵, un aspecto que no se discutirá en esta revisión. Dentro del dominio A2 desplegado, los residuos de la hoja $\beta 4$ Leu1603-Met1606 son accesibles para el sitio activo del dominio de metaloproteasa ADAMTS13, lo que permite la hidrólisis del enlace escindible Tyr1605-Met1606.^{56,5}

Para que este proceso se desarrolle de manera eficiente, el α Los residuos de 4 bucles menos Asp1614-Asp1622 interactúan con el Dominio desintegrina, la región de hoja $\alpha 5$ -hélice/ $\beta 6$ Ile1642-Ile1651 se une al dominio rico en cisteína y los residuos de hélice $\alpha 6$ Glu1660-Arg1668 se asocian al dominio espaciador de ADAMTS13.

Dado el estricto control de la conformación del dominio A2, no sorprende que esta regulación pueda verse alterada por una amplia gama de mutaciones. Por ejemplo, algunas mutaciones promoverán la exposición del sitio de escisión que de otro modo estaría enterrado (como Met1528Val o Glu1638Lys), mientras que otras retrasarán el replegamiento del dominio A2 (por ejemplo, Arg1597Trp), prolongando el tiempo que ADAMTS13 puede escindir el enlace Tyr1605-Met1606.

Estas mutaciones finalmente resultan en una mayor degradación del VWF mediada por ADAMTS13 y se conocen como mutaciones del grupo 2 de EVW tipo 2A. Los pacientes portadores de tales mutaciones presentan una pérdida de multímeros de alto peso molecular y un mayor riesgo de hemorragia.

La mayor degradación del FvW también es común en la EvW tipo 2B. La degradación del VWF aumenta aún más con la unión de FVIII o Gplb α , lo que sugiere que estos ligandos modulan el despliegue o replegamiento del dominio A2. La susceptibilidad a la proteólisis mediada por ADAMTS13 depende del tamaño del multímero. Los multímeros más grandes se despliegan más fácilmente que los multímeros más pequeños cuando se exponen a un flujo irregular, lo que permite que ADAMTS13 ataque el sitio de proteólisis.^{7,8} Esta característica es particularmente visible en pacientes que manifiestan alteración del flujo sanguíneo, en pacientes con estenosis aórtica severa o aquellos que reciben soporte circulatorio mecánico.

Estos pacientes a menudo se caracterizan por una mayor degradación del VWF, con una pérdida visible de los multímeros de alto peso molecular unión de colágeno al dominio A3. El dominio A3 abarca los residuos Pro1684-Ser1873, que contienen un puente disulfuro que conecta los extremos N y C de este dominio (Cys1686-Cys1872). El dominio A3 media la unión al colágeno tipos I y III.⁶⁴ La estructura cristalina del dominio A3 fue resuelta de forma independiente por dos grupos, lo que les permitió confirmar el pliegue típico de VWA con hélices α y láminas β alternas. Se identificó un sitio potencial de unión de colágeno que involucra la lámina β 3 y las

hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$ mediante un extenso análisis mutacional.

La determinación del sitio interactivo exacto del colágeno se facilitó cuando se identificó un péptido de colágeno III que se une específicamente al VWF.⁶⁸ Este péptido se usó para generar un cocrystal que contenía el complejo de dominio A3/péptido de colágeno. De hecho, el péptido de colágeno se une a la región que abarca la hoja $\beta 3$ y las hélices $\alpha 2/\alpha 3$, cubriendo una superficie de aproximadamente 24 Å de ancho y 30 Å de largo.

En total, se han identificado 14 aminoácidos dentro del dominio A3 que directamente interactúan con el péptido de colágeno. El análisis del complejo también permitió la identificación de aminoácidos complementarios en el colágeno I y III implicados en la unión al VWF.

En particular, la estructura ha ayudado a explicar por qué tanto el colágeno I como el III son capaces de unirse al VWF en el mismo sitio a pesar de sus diferencias estructurales. Inesperadamente, solo se han identificado 2 mutaciones de pacientes que están directamente dentro de la superficie interactiva: Val1760Ile y Arg1779Leu, aunque no se ha informado específicamente si estas mutaciones realmente afectan la unión del colágeno.

Las mutaciones de los pacientes que se han descrito para modular la unión del colágeno en realidad están fuera de esta superficie (Leu1696Arg, Ser1731Thr, Trp1745Lys, Ser1783Ala, His1786Asp y Pro1824His). El mecanismo subyacente por el cual alteran la unión del colágeno aún no está claro, pero puede estar relacionado con una alteración indirecta de la superficie de unión del colágeno. La unión al colágeno se parece a la de Gplb α en que los multímeros más grandes son más eficientes en la unión del colágeno en comparación con los multímeros más pequeños.

Por el contrario, la unión del colágeno difiere de la unión de Gplba porque puede ocurrir ya en condiciones estáticas, lo que indica que el dominio A3 no requiere cambios conformacionales inducidos por cizallamiento para exponer su sitio de unión al colágeno. ¿Significa esto que el dominio A3 es bastante estático en términos de conformación? Probablemente no, y hay dos indicios que apuntan en esta dirección. En primer lugar, tras la asociación del FVW al colágeno, la afinidad del FVW por el FVIII se reduce, lo que da lugar a la liberación de FVIII.⁷⁶ Por lo tanto, la unión del colágeno a través del dominio A3 provoca cambios estructurales hacia la región D'D3. En segundo lugar, recientemente identificamos un nanocuerpo (KB-VWF-D3.1), cuyos sitios de unión se superponen al sitio de unión del colágeno (Figura 9B).⁷⁷ Su unión dependía estrictamente de que el dominio A2 estuviera intacto, y la proteólisis mediada por ADAMTS13 era asociado con una pérdida de unión. Una posible explicación es que la escisión en el dominio A2 induce cambios en el dominio A3 adyacente, en particular el sitio de unión del colágeno. Como tal, ADAMTS13 no sólo modula la unión del colágeno reduciendo el tamaño del multímero, sino también modificando indirectamente la exposición del sitio de unión del colágeno.

6.4.5.3 Unión de $\alpha\text{IIb}\beta_3$ al dominio C4

La porción C-terminal de la subunidad madura del VWF contiene 6 dominios C de von Willebrand (VWC) consecutivos, también conocidos como dominios ricos en cisteína similares a los de la coordina.

Cada dominio es relativamente pequeño en comparación con los dominios A y D, y contiene entre 68 y 80 residuos. El pliegue general del VWC comprende dos subdominios (SD1 y SD2) que están unidos por un puente disulfuro. SD1 contiene 5 cadenas β antiparalelas y el dominio SD2 contiene 2 cadenas β antiparalelas, y los puentes disulfuro internos entre las cadenas β ayudan a estabilizar el pliegue general del módulo VWC. De hecho, cada dominio VWC contiene un motivo CxxCxC y un motivo CCxxC, que median la formación de estos puentes

disulfuro. Aunque las estructuras de los dominios VWC homólogos se habían resuelto previamente, hubo que esperar hasta 2019 para que se informara la primera estructura de un dominio C de VWF, es decir, el dominio C4 (residuos Ser2497 - Glu2577). La relevancia de resolver la estructura del dominio C4 es que contiene un motivo RGD que media la unión de VWF a las integrinas $\alpha\text{IIb}\beta_3$ y $\alpha\text{IIb}\beta_3$.

Como se esperaba, el dominio C4 muestra un pliegue típico de VWC caracterizado por varias hebras β antiparalelas en SD1 y SD2 (Figura 6A-B). Sin embargo, la distribución de los puentes disulfuro difiere de otras instancias del pliegue. El colágeno IIA, el factor de red de comunicación celular-3 y Crossveinless-2 comparten cinco disulfuros.⁸³ Cuatro de estos también se encuentran en el dominio C4 de VWF. Sin embargo, un disulfuro conservado que conecta las cadenas β βII y βIII en SD1 de otras proteínas no se encuentra en el dominio C4 del VWF, que en cambio contiene un disulfuro único que une las cadenas βI y βII en SD2. Una segunda característica única es la presencia del motivo RGD en el dominio C4 del VWF, que se encuentra en la porción N-terminal del dominio SD1, entre las cadenas $\beta\text{I}'$ - y $\beta\text{II}'$.

En la mayoría de los dominios VWC, estas cadenas b están separadas por un bucle muy corto de 2 aminoácidos, mientras que en el dominio C4 del VWF esta secuencia consiste en una estructura en horquilla de 10 aminoácidos, lo que permite la exposición externa del motivo RGD. La exposición continua del sitio RGD es compatible con la idea de que el VWF puede unirse a $\alpha\text{IIb}\beta_3$ en condiciones estáticas. En términos de visualización, actualmente no se ha informado de ningún co- complejo de alta resolución del dominio C4 con $\alpha\text{IIb}\beta_3$. Sin embargo, Zhou et al. generaron imágenes de microscopía electrónica de baja resolución del fragmento VWF D4-CK en complejo con $\alpha\text{IIb}\beta_3$.⁵

En estas imágenes, $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ está unido perpendicularmente al dominio C4, lo que confirma aún más que el motivo RGD está bien expuesto. Sin embargo, la exposición del RGD depende de alguna manera de la conformación, como lo ilustra el hallazgo de que las mutaciones dentro de los dominios C vecinos se han asociado con una unión reducida del VWF a $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Parece probable que estas mutaciones perturben la conformación del RGD interactivo. superficie. En cuanto al dominio C4 en sí, las mutaciones dentro de este dominio que afectan la unión de $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ son raras y, hasta donde sabemos, solo se han informado dos: Val2517Phe y Arg2535Pro.

Estas mutaciones están asociadas con un Tendencia leve al sangrado y puede clasificarse como EvW tipo 2M. En línea con esta tendencia al sangrado leve están las observaciones de que el bloqueo del motivo RGD usando un anticuerpo monoclonal o mediante mutagénesis da como resultado una tendencia al sangrado leve en ratones. Curiosamente, el análisis detallado de la formación de trombos en tiempo real en estos ratones reveló un aumento de la inestabilidad del trombo. Esto sugiere que la interacción VWF/ $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ contribuye a la estabilización de las interacciones plaquetas-plaquetas, similar al papel del fibrinógeno. En términos de multimerización, parece que la unión del VWF a $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ es independiente del tamaño del multímero. Al comparar plasmas de 85 sujetos normales y 115 pacientes con diferentes tipos de EvW, incluidos el tipo 2A y el tipo 2B, no se detectaron diferencias en la unión de $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (Yokomori *et al.*, 2023).

VI CONCLUSIONES

La enfermedad de von Willebrand es muy heterogénea basados en los mecanismos bioquímicos que sean descrito, donde participan un gran número de biomoléculas para la conformación de los complejos de coagulación. Desgraciadamente en México existen pocos estudios que aborden esta temática, por ello es indispensable realizar compilaciones científicas y clínicas, para establecer un diagnóstico correcto, manejo de la información y plantear nuevos enfoques terapéuticos.

Siendo los datos clínicos médicos más comunes que podemos emplear desde un punto de vista preventivo acorde al conocimiento de la enfermedad a temprano diagnostico son:

1. A la exploración. Se detectan petequias en el interior de la boca y manos y, partes del cuerpo
2. Sangrado de encías prolongado
3. Epistaxis nasal
4. hemorragias en intervenciones quirúrgicas o dentales
- 5.

El tratamiento está basado en desmopresina, concentrados de FvW, antifibrinolíticos, estrógenos y transfusiones plaquetarias.

Por lo que el diagnóstico y tratamiento adecuado es imprescindible para evitar complicaciones y hemorragias mortales, principalmente durante cirugía o procedimientos odontológicos

REFERENCIA

1. Barrow LL, Simin K, Mohlke K, Nichols WC, Ginsburg D, Meisler MH. Conserved linkage of neurotrophin-3 and von Willebrand factor on mouse chromosome 6. *Mamm Genome*. 1993;4(6):343-345
2. Bowman M, Hopman WM, Rapson D, Lillicrap D, James P. The prevalence of symptomatic von Willebrand disease in primary care practice. *J Thromb Haemost* 2010; 8(1):213-216.
3. Branchford BR, Di Paola J. Making a diagnosis of VWD. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012, 2012:161-167
4. Buga-Corbu I, Arion C. Up to date concepts about Von Willebrand disease and the diagnose of this hemostatic disorder. *J Med Life* 2014, 15;7(3):327-334
5. Cao W, Krishnaswamy S, Camire RM, Lenting PJ, Zheng XL. Factor VIII accelerates proteolytic cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS13. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008, 27;105(21):7416-7421
6. Castaman G, Goodeve A, Eikenboom J; European Group on von Willebrand Disease. Principles of care for the diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Haematologica* 2013, 8(5):667-74.
7. Collins CJ, Underdahl JP, Levene RB, Ravera CP, Morin MJ, Dombalagian MJ, Ricca G, Livingston DM, Lynch DC. Molecular cloning of the human gene for von Willebrand factor and identification of the transcription initiation site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987, 84(13):4393-7.
8. Cumming A, Grundy P, Keeney S, Lester W, Enayat S, Guilliatt A, Bowen D, Pasi J, Keeling D, Hill F, Bolton-Maggs PH, Hay C, Collins P; UK Haemophilia Centre Doctors' Organisation. An investigation of the von Willebrand factor genotype in UK patients diagnosed to have type 1 von Willebrand disease. *Thromb Haemost*. 2006, 96(5):630-41
9. Dong X, Leksa NC, Chhabra ES, Arndt JW, Lu Q, Knockenhauer KE, Peters RT, Springer TA. The von Willebrand factor D'D3 assembly and

- structural principles for factor VIII binding and concatemer biogenesis. *Blood*. 2019, 4;133(14):1523-1533.
10. Espinosa G, Reverter JC. Coagulación y fibrinólisis plasmática. Estados de hipercoagulabilidad. *Medicina Integral* 2001, 38 (4), 156-166
 11. Flores-Rivera OI, Ramírez-Morales K, Martín Meza-Márquez, JM, Nava-López JA, *Revista Mexicana de Anestesiología* 2014, 37(2), S382-S386
 12. Gao W, Anderson PJ, Sadler JE. Extensive contacts between ADAMTS13 exosites and von Willebrand factor domain A2 contribute to substrate specificity. *Blood*. 2008, 1;112(5):1713-1719.
 13. Gao Z, Liu F, Yu Z, Bai X, Yang C, Zhuang F, Ruan C. Effects of von Willebrand factor concentration and platelet collision on shear-induced platelet activation. *Thromb Haemost*. 2008, 100(1):60-68.
 14. Ginsburg D, Handin RI, Bonthron DT, Donlon TA, Bruns GA, Latt SA, Orkin SH. Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization. *Science*. 1985 Jun 21;228(4706):1401-1406.
 15. González-Villalva A, Bizarro-Nevarés P, Rojas-Lemus M, López-Valdez N, Ustarroz-Cano M, Barbosa-Barrón F, García-Gil B, Albarrán-Alonso JC, Fortoul van der Goes TI. El megacariocito: una célula muy original. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 2019, 62(1), 6-18.
 16. Goodeve A. Genetics of type 1 von Willebrand disease. *Curr Opin Hematol*. 2007, 14(5):444-9
 17. Goodeve AC. The genetic basis of von Willebrand disease. *Blood Rev*. 2010, 24(3):123-134
 18. Hernández-Zamora E, Zavala-Hernández C, Quintana-González S, Reyes-Maldonado E. Enfermedad de von Willebrand, biología molecular y diagnóstico [Von Willebrand disease. Molecular biology and diagnosis]. *Cir Cir*. 2015, 83(3):255-264

19. Hernández-Zamora E, Zavala-Hernández C, Quintana-González S, Reyes-Maldonado E. Enfermedad de von Willebrand, biología molecular y diagnóstico [Von Willebrand disease. Molecular biology and diagnosis]. *Cir Cir.* 2015, 83(3):255-64
20. Huizinga EG, Tsuji S, Romijn RA, Schiphorst ME, de Groot PG, Sixma JJ, Gros P. Structures of glycoprotein Ibalpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain. *Science.* 2002, 16;297(5584):1176-1179.
21. James AH. More than menorrhagia: a review of the obstetric and gynaecological manifestations of von Willebrand disease. *Thromb Res.* 2007;120 Suppl 1:S17-20
22. James PD, Goodeve AC. von Willebrand disease. *Genet Med.* 2011 13(5):365-76
23. James PD, Lillicrap DP. The diagnosis and management of von Willebrand disease in Canada. *Semin Thromb Hemost.* 2011, 37(5):522-7.
24. James PD, Notley C, Hegadorn C, Leggo J, Tuttle A, Tinlin S, Brown C, Andrews C, Labelle A, Chirinian Y, O'Brien L, Othman M, Rivard G, Rapson D, Hough C, Lillicrap D. The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease: Results from a Canadian cohort study. *Blood.* 2007 Jan 1;109(1):145-54
25. James PD, Notley C, Hegadorn C, Poon MC, Walker I, Rapson D, Lillicrap D; Association of Hemophilia Clinic Directors of Canada. Challenges in defining type 2M von Willebrand disease: results from a Canadian cohort study. *J Thromb Haemost.* 2007, 5(9):1914-22
26. Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T. VWF73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS-13. *Blood* 2004, 15;103(2):607-612.
27. Krishnaswamy S. FVIII-VWF dos-à-dos. *Blood.* 2015 Aug 20;126(8):923-4.
28. Lillicrap D. Ciencia Básica, Diagnóstico y Tratamiento Médico de la

Enfermedad De Von Willebrand, Tratamiento de la Hemofilia 2008, No. 35.
Publicado por la Federación Mundial de Hemofilia (FMH), 2004

29. Lillicrap D. Genotype/phenotype association in von Willebrand disease: is the glass half full or empty? *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2009, 7 (Suppl. 1): 65–70
30. Majluf-Cruz A, Velez-Ruelas MA, Gonzalez-Avila AI, Garcia-Chávez J, Berges A, Lopez-Santiago N, Monroy-Garcia R, Moreno-Hernandez M, Corona-De La Peña N, Alvarado-Moreno JA, Isordia-Salas I, Hernandez Juarez J. von Willebrand's disease in Mexico: a pilot study. *Haemophilia*. 2013, 19(2):231-235
31. Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Worrall NK, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, Alevy YG, Sadler JE. Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 1989 Nov 25;264(33):19514-19527
32. Mannucci PM. Treatment of von Willebrand's Disease. *N Engl J Med*. 2004 12;351(7):683-694.
33. Matsumoto M, Harada K. [Development of a novel aptamer blocking the interaction between the VWF A1 domain and platelet GP Ib for the treatment of arterial thrombosis]. *Rinsho Ketsueki*. 2022, 63(5):393-402
34. Michaux G, Abbitt KB, Collinson LM, Haberichter SL, Norman KE, Cutler DF. The physiological function of von Willebrand's factor depends on its tubular storage in endothelial Weibel-Palade bodies. *Dev Cell* 2006, 10(2):223-232
35. Michaux G, Pullen TJ, Haberichter SL, Cutler DF. P-selectin binds to the D'-D3 domains of von Willebrand factor in Weibel-Palade bodies. *Blood* 2006, 15;107(10):3922-3924.
36. Ng, Chiew Fen, Ng, Poh Kiat. (2015). A Review of Intrinsic and Extrinsic Motivations of ESL Learners.
37. O'Brien LA, James PD, Othman M, Berber E, Cameron C, Notley CR, Hegadorn CA, Sutherland JJ, Hough C, Rivard GE, O'Shaunessey D,

- Lillicrap D; Association of Hemophilia Clinic Directors of Canada. Founder von Willebrand factor haplotype associated with type 1 von Willebrand disease. *Blood*. 2003, 15;102(2):549-57.
- 38.Sadler JE, Budde U, Eikenboom JCI, Favaloro EI, Hill FGH, *et al*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2006, 4(10) 1538-7836
- 39.Sadler JE. A revised classification of von Willebrand disease. For the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost*. 1994 71(4):520-5. PMID: 8052974.
- 40.Shelton-Inloes BB, Broze GJ Jr, Miletich JP, Sadler JE. Evolution of human von Willebrand factor: cDNA sequence polymorphisms, repeated domains, and relationship to von Willebrand antigen II. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987, 29;144(2):657-65.
- 41.Shelton-Inloes BB, Chehab FF, Mannucci PM, Federici AB, Sadler JE. Gene deletions correlate with the development of alloantibodies in von Willebrand disease. *J Clin Invest*. 1987, 79(5):1459-65
- 42.South K, Lane DA. ADAMTS-13 and von Willebrand factor: a dynamic duo. *J Thromb Haemost*. 2018 Jan;16(1):6-18.
- 43.Sporn LA, Marder VJ, Wagner DD. von Willebrand factor released from Weibel-Palade bodies binds more avidly to extracellular matrix than that secreted constitutively. *Blood*. 1987, 69(5):1531-1534
- 44.Titani K, Kumar S, Takio K, Ericsson LH, Wade RD, Ashida K, Walsh KA, Chopek MW, Sadler JE, Fujikawa K. Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry*. 1986 Jun 3;25(11):3171-3184
- 45.Vayne C, Gruel Y, Pouplard C. Hemostasia: fisiología y principales pruebas de exploración, EMC - Tratado de Medicina 2021, 25(1), 1-10.
- 46.Verweij CL, de Vries CJ, Distel B, van Zonneveld AJ, van Kessel AG, van Mourik JA, Pannekoek H. Construction of cDNA coding for human von Willebrand factor using antibody probes for colony-screening and mapping

- of the chromosomal gene. *Nucleic Acids Res.* 1985, 11;13(13):4699-4717.
47. Wagner DD, Bonfanti R. von Willebrand factor and the endothelium. *Mayo Clin Proc* 1991, 66(6):621-627.
48. Wagner DD, Saffaripour S, Bonfanti R, Sadler JE, Cramer EM, Chapman B, Mayadas TN. Induction of specific storage organelles by von Willebrand factor polypeptide. *Cell* 1991, 25;64(2):403-13.
49. Wu JJ, Fujikawa K, McMullen BA, Chung DW. Characterization of a core binding site for ADAMTS-13 in the A2 domain of von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, 103(49):18470-18474
50. Yokomori R, Shirai T, Tsukiji N, Oishi S, Sasaki T, Takano K, Suzuki-Inoue K. C-type lectin-like receptor-2 (CLEC-2) is a key regulator of kappa-carrageenan-induced tail thrombosis model in mice. *Platelets.* 2023, 34(1):2281941
51. Zhou YF, Eng ET, Nishida N, Lu C, Walz T, Springer TA. A pH-regulated dimeric bouquet in the structure of von Willebrand factor. *EMBO J.* 2011, 19;30(19):4098-4111.