



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

*TESIS*

**“Escrutinio clínico-laboratorial de enfermedad von Willebrand y su confirmación diagnóstica ponderada por grupo sanguíneo y análisis de multímeros de FvW en población pediátrica del CMNO”**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE HEMATÓLOGO PEDIATRA

**Tesista:**

MAYRA PATRICIA LÓPEZ MONTEJO.

Residente de segundo año de la Subespecialidad en Hematología Pediátrica, Centro Médico Nacional de Occidente, U.M.A.E Hospital de Pediatría, IMSS.

**Tutora y Directora de Tesis:**

**Dra. Janet Margarita Soto Padilla.**

Pediatra Hematóloga, adscrita al servicio de Hematología Pediátrica del Hospital de Pediatría U.M.A.E. Hospital de Pediatría, IMSS.

**Asesora externa:**

**Dra. Ana Rebeca Jaloma Cruz**

Dra. en Genética Humana, investigadora adscrita a la División de Genética del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS

Guadalajara, Jalisco. Febrero 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **COLABORADORES.**

### ***En la realización de la pruebas de laboratorio de escrutinio y confirmatorias:***

#### **Quim. Juan Manuel Romero**

Laboratorio de Hematología Especial

U.M.A.E. Hospital de Pediatría, C.M.N.O. IMSS.

#### **LAQB. María Guadalupe Zavelia Padilla Romo**

Estudiante de Doctorado en Genética Humana, CUCS, Universidad de Guadalajara.

División de Genética, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS

### ***En la asesoría del análisis estadístico***

#### **Ing. Rogelio Troyo Sanromán.**

Coordinación de Investigación en Posgrado

Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

## **RESUMEN.**

**“Escrutinio clínico-laboratorial de enfermedad von Willebrand y su confirmación diagnóstica ponderada por grupo sanguíneo y análisis de multímeros de FvW en población pediátrica del CMNO”.**

## **ANTECEDENTES**

La enfermedad von Willebrand (EvW) es el padecimiento hemorrágico más frecuente a nivel mundial y por lo tanto presente en la población mexicana a pesar del subdiagnóstico predominante. En estudios previos realizados en Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente se integró un posible diagnóstico de acuerdo a las pruebas de escrutinio y confirmatorias iniciales por la relación entre los valores de función y nivel de antígeno del factor von Willebrand, lo cual debe ser verificado por el análisis de multímeros de FvW y considerando el grupo sanguíneo del paciente.

**OBJETIVO.** Realizar un escrutinio clínico-laboratorial en pacientes con sospecha de EvW confirmando su diagnóstico por la relación entre la actividad y el nivel de antígeno de FvW ponderado por el grupo sanguíneo y su confirmación por análisis de multímeros en pacientes del Hospital de Pediatría del CMNO.

**MATERIAL Y METODO.** Se realizó un estudio transversal, analítico en pacientes pediátricos con edad entre 1 hasta 16 años de edad que fueron valorados en el 2013 por el servicio de hematología pediátrica en la consulta externa por trastornos hemorrágicos y sospecha de enfermedad de von Willebrand y aquellos captados en estudios previos desde 2010. Una vez cumpliendo los criterios de selección, se hicieron de laboratorio de escrutinio y confirmatorios y realizaron de análisis de multímeros. Se realizó estadística descriptiva, para variables cualitativas se calcularon medias, desviaciones estándar y se aplicó prueba de chi-cuadrada. Para las variables cuantitativas se realizó análisis de varianza (ANOVA) y prueba de homogeneidad de varianzas.

**RESULTADOS.** Se estudiaron un total de 94 pacientes. 49 mujeres (52.1%) y 45 hombres (47.8%). El promedio de edad fue de 9 años. Presentaron grupo O 65

pacientes (61.1%) y 19 pacientes (17.8%) grupos A, B y AB (clasificados como grupo no O). Los antecedentes familiares de sangrado mucocutáneo se presentaron en 62 pacientes (66%). En nuestra población de estudio, la manifestación hemorrágica que se observó con más frecuencia fue la epistaxis en 58 pacientes (61%). El diagnóstico probable que con más frecuencia se presentó fue el clasificado como enfermedad de von Willebrand tipo 2, con 34 pacientes (36%). De acuerdo a las manifestaciones clínicas y grupo sanguíneo, predominaron los pacientes del grupo O con cuadros de hemorragias principalmente epistaxis en 41 pacientes (43.61%). Se realizó la prueba exacta de Fisher para correlacionar el grupo sanguíneo y el diagnóstico probable, observando que los pacientes con grupo sanguíneo O fueron los que presentaron enfermedad de von Willebrand con más frecuencia pero estadísticamente no fue significativo. Se realizó confirmación diagnóstica en 27 pacientes encontrándose el tipo 2M con más frecuencia. La concordancia global fue del 96%, con una sola inconsistencia en 27 casos confirmados.

**CONCLUSIONES.** Es importante considerar la relación entre las manifestaciones clínicas, el FvW: Rco, Factor VIII:C y FvW Ag para identificar variantes cuantitativas y en caso de sospecha de variantes cualitativas la confirmación con estudio de multímeros. Se descarta hipótesis de diferencia de acuerdo a grupo sanguíneo a pesar que son evidentes las tendencias de menores niveles (Fvw:Ag y FvW:Rco) en pacientes con grupo O, importantes de considerar en pacientes con niveles antigénicos en el límite de normalidad y sintomatología hemorrágica. La variante tipo 2 de la enfermedad de von Willebrand se presentó más frecuente en pacientes pediátricos del Centro Médico de Occidente, subtipo de la EvW frecuente en población hospitalaria. En pacientes con trastorno hemorrágicos en los que se descartó EvW y se sospechó de una trombocitopatía, es necesario continuar con un abordaje diagnóstico que incluya el frotis sanguíneo, la agregometría plaquetaria e inmunofenotipo plaquetario.

## INDICE

<b>I. MARCO TEORICO.....</b>	<b>8</b>
1. Historia.....	8
2. Definición.....	8
3. Epidemiología.....	9
4. Cuadro clínico.....	9
5. Clasificación de los tipos de enfermedad de Von Willebrand.....	10
5.1 Enfermedad de Von Willebrand tipo I.....	11
5.2 Enfermedad Von Willebrand tipo 2.....	11
5.3 Características de los subtipos.....	12
5.4 Enfermedad Von Willebrand tipo 3.....	15
5.5 Criterios clínicos para la evaluación de la historia de sangrado.....	16
6. Fisiología y aspectos moleculares de la enfermedad de Von Willebrand..	19
6.1 Gen del factor de Von Willebrand.....	19
6.2 Proteína de FvW.....	23
6.3 Interacción de FvW con FVIII.....	23
6.4 Factores que intervienen en la expresividad del fenotipo de la EvW..	24
6.4.1 Grupo sanguíneo y factor de Von Willebrand.....	24
7. Diagnóstico.....	26
7.1 Análisis de multímeros del factor de Von Willebrand.....	28
8. Tratamiento.....	31
9. Estudios previos al proyecto en pacientes pediátricos con sospecha de EVW en la UMAE PEDIATRIA DEL CMNO, IMSS.....	34
<b>II. JUSTIFICACION.....</b>	<b>36</b>
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>37</b>
<b>IV. HIPOTESIS.....</b>	<b>38</b>
<b>V. OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>VI. MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>40</b>

VI.1. Clasificación del estudio.....	40
VI.2. Universo de trabajo. ....	40
VI.3 .Variables .....	40
VI.4. Cálculo del tamaño de muestra.....	47
VI.5 Criterios de selección de los grupos de estudio. ....	47
VI.6 Lugar de estudio:.....	48
<b>VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>48</b>
<b>VIII. CONSIDERACIONES ÉTICAS .....</b>	<b>49</b>
<b>IX. ORGANIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>49</b>
<b>X. DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL DIAGNÓSTICO CONFIRMATORIO DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND.....</b>	<b>52</b>
<b>XI. RECURSOS HUMANOS.....</b>	<b>53</b>
<b>XII. RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
<b>XIII. DISCUSION.....</b>	<b>64</b>
<b>XIV. CONCLUSIONES.....</b>	<b>68</b>
<b>XV. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS. ....</b>	<b>69</b>
<b>XVI. ANEXOS .....</b>	<b>73</b>
<b>1) ANEXO 1. CUESTIONARIO DE VALORACION CLINICA.....</b>	<b>73</b>
<b>2) ANEXO 2. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.....</b>	<b>76</b>
<b>3) ANEXO 3. TÉCNICAS. ....</b>	<b>78</b>

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1. Datos clínicos más frecuentes en los pacientes con EvW. ....</b>	<b>10</b>
<b>Cuadro 2. Tipos de Enfermedad de von Willebrand.....</b>	<b>16</b>
<b>Cuadro 3. Criterios para calcular el sangrado en pacientes con EvW. ....</b>	<b>17</b>
<b>Cuadro 4. Influencia del grupo sanguíneo ABO en los niveles del FvW:Ag ..</b>	<b>25</b>
<b>Cuadro 5. Criterios de laboratorio en EvW. ....</b>	<b>28</b>
<b>Cuadro 6. Interpretación del patrón de multímeros. ....</b>	<b>30</b>
<b>Cuadro 7. Manifestaciones clínicas en los pacientes estudiados. ....</b>	<b>55</b>
<b>Cuadro 8. Valores de media y desviación estándar de las pruebas de escrutinio y confirmatorias de los pacientes por grupo sanguíneo.....</b>	<b>58</b>
<b>Cuadro 9. Clasificación diagnóstica y grupo sanguíneo en pacientes pediátricos. ....</b>	<b>60</b>
<b>Cuadro 10. Severidad de sangrado en los pacientes estudiados.....</b>	<b>60</b>
<b>Cuadro 11. Evaluación de los parámetros clínico-laboratoriales por prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA. ....</b>	<b>61</b>
<b>Cuadro 12. Casos representativos de los pacientes con pruebas iniciales confirmatorias. ....</b>	<b>63</b>
<b>Cuadro 13. Concordancia del diagnóstico de EvW por la relación FvW:Rco / FvW:Ag y el análisis de multímeros de FvW (n= 27 casos confirmados). ....</b>	<b>63</b>



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Estructura del gen FvW. ....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 2. Estructura del FvW .....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 3. Síntesis, procesamiento intracelular y secreción del FvW .....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 4. Función hemostática del FvW a través de las interacciones con componentes plasmáticos, endoteliales y plaquetarios .....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 5. Ejemplo de multímeros en gel.....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 6. Análisis de multímeros de FvW.....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 7. Análisis de los multímeros del FvW .....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 8. Espectro de valores de laboratorio en los diferentes tipos de FvW. ....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 9. Clasificación diagnóstica definida en la población de pacientes por la evaluación clínico-laboratorial.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 10. Manifestaciones clínicas y grupo sanguíneo en pacientes pediátricos. ....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 11. Análisis de multímeros de FvW en 10 pacientes estudiados. ....</b>	<b>62</b>

## **I. MARCO TEORICO.**

### **1. Historia.**

La enfermedad de von Willebrand (EvW) fue descrita por primera vez en 1926 por un médico finlandés llamado Erik von Willebrand. Este describió en la publicación original un grave trastorno hemorrágico mucocutáneo en una familia del archipiélago Aland en el mar Báltico. El caso índice de esta familia, una mujer joven llamada Hjórdis, presentó en su cuarta menstruación una hemorragia que le causó la muerte. Por lo menos otros cuatro miembros de la familia fallecieron a consecuencia de una hemorragia grave, y a pesar de que inicialmente se les diagnosticó “pseudohemofilia”, el Dr. Von Willebrand comprobó que, a diferencia de la hemofilia, esta enfermedad afectaba a ambos sexos.<sup>1</sup>

A mitad de los años cincuenta se descubrió que este trastorno solía ir acompañado de una disminución en la actividad del nivel del factor VIII (FVIII), y el fenotipo hemorrágico podía corregirse con la transfusión de plasma normal. A principios de los años setenta se realizó la importante diferenciación inmunológica entre el FVIII y el factor de von Willebrand (FvW) y desde entonces se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de la fisiopatología molecular de este trastorno.<sup>1</sup>

### **2. Definición.**

La enfermedad de von Willebrand (EvW) es una alteración del FvW, una gran glucoproteína multimérica que contribuye a la adherencia de plaquetas al endotelio dañado y sirve como un transportador proteínico para el FVIII plasmático.

La enfermedad de von Willebrand es muy común, pero es una alteración heterogénea que es el resultado de una variedad de defectos genéticos desde la ausencia congénita de FvW en la cual la estructura y función de la molécula es marcadamente anormal, es autosómica dominante; entonces, en contraste con la hemofilia A y la hemofilia B, la incidencia de EvW en hombres y mujeres es comparable.<sup>2</sup>

### **3. Epidemiología**

En población blanca se estima una frecuencia desde 30 casos por 1 millón de habitantes, hasta el 1% de la población. Los casos de EvW sintomáticos se estiman en 100 por millón de habitantes. Aproximadamente 125 individuos por millón presentan EvW sintomática en los Estados Unidos, esta incidencia es más del doble que la informada para la hemofilia en ese país. En algunas regiones de Europa se ha estimado que la prevalencia de la enfermedad pueda ser mayor. En Latinoamérica, Jiménez y col., informaron una incidencia del 1.1% de EvW en Costa Rica, Chile 2.71 casos por millón y Venezuela 1.6.<sup>3</sup>

En México se estima que la prevalencia de la enfermedad es muy inferior a las cifras informadas en la población de origen europeo. De acuerdo a la información publicada por la Federación Mundial de Hemofilia, México tiene 165 casos diagnosticados. Si nos basamos en las estimaciones mundiales de 100 casos de EvW sintomáticos por cada millón de habitantes, en México deben existir aproximadamente 1000 casos.<sup>3</sup>

Viveros Sandoval y Martínez Murillo han estudiado 30 casos en México, pero la incidencia real se desconoce.<sup>3</sup>

La EvW es el trastorno congénito de sangrado comúnmente diagnosticado, con una prevalencia entre 1 por cada 10,000 individuos. El tipo 1 de la EvW es el subtipo más común representando 75-80% de todos los casos mientras que el subtipo 3 de la EvW ocurre en aproximadamente 1 por millón en la población en los Estados Unidos y Europa.<sup>4</sup>

### **4. Cuadro clínico.**

La enfermedad se caracteriza por la presencia de hemorragias mucocutáneas de intensidad variable y que tiende a ser fluctuante, es decir alternan periodos hemorrágicos con periodos asintomáticos, lo que dificulta el diagnóstico de la enfermedad. Los síntomas son más intensos en niños y adolescentes. Cuadro 1.

La epistaxis es el principal síntoma con una frecuencia del 60%, las metrorragias constituyen el principal síntoma en las mujeres adolescentes, con una frecuencia hasta del 75%. Los niños frecuentemente presentan equimosis de aparición

espontánea que sugiere la posibilidad de EvW. La EvW puede ser diagnosticada después de un procedimiento quirúrgico con hemorragia transoperatoria y posoperatoria, particularmente después de amigdalectomías o extracciones dentales.<sup>3</sup>

**Cuadro 1.** Datos clínicos más frecuentes en los pacientes con EvW.

DATOS CLINICOS	FRECUENCIA DE PRESENTACION (%)
Epistaxis	60
Equimosis	40
Hemorragia transvaginal	35
Gingivorragia.	35
Hemorragia postendodoncia.	50
Hemorragia postparto.	25
Hemorragia gastrointestinal.	10
Hematuria.	5
Hematomas*	1
Hemartrosis*	1

\* Estos defectos ocurren más frecuentemente en el tipo 3, o en la EvW tipo Normandy. Martínez-Murillo C. 2011.<sup>3</sup>

### 5. Clasificación de los tipos de enfermedad de Von Willebrand.

La publicación más reciente de las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia, respecto a la clasificación de la enfermedad von Willebrand se realizó en el 2006. En esta clasificación, basada principalmente en el fenotipo de laboratorio de la proteína del FvW y que reconoce tres variantes la EvW es considerada como un rasgo cuantitativo (tipos 1 y 3) o cualitativo (variantes tipo 2) Cuadro 2.

### **5.1 Enfermedad de Von Willebrand tipo I.**

La enfermedad de tipo 1 es la variante más frecuente, constituye el 80% de los casos observados. Representa un defecto cuantitativo de la concentración plasmática de FvW. La intensidad clínica de la afección es muy variable, se correlaciona con la disminución global de la concentración plasmática del FvW y el FVIII, el patrón de herencia es autosómico dominante.<sup>3,5</sup>

La concentración de factor VIII disminuye en relación proporcional con la intensidad de la enfermedad de tipo 1 y el resultado es una prolongación del TPT (Tiempo de Tromboplastina Parcial). El análisis de los multímeros de FvW muestra una disminución discreta a moderada de todas las formas, pero por lo demás equilibrada.<sup>6</sup>

El embarazo, el consumo de estrógenos y los estados inflamatorios pueden incrementar de manera artificial la cifra de FvW, incluso hasta el punto de enmascarar el diagnóstico de una EvW leve de tipo 1.<sup>7</sup> La EvW tipo 1 es fácilmente distinguible del tipo 3, por la deficiencia leve a moderada del FvW (10-40 U dL<sup>-1</sup>).<sup>6</sup>

### **5.2 Enfermedad Von Willebrand tipo 2.**

El patrón de herencia es principalmente autosómico dominante. Se distingue por un defecto cualitativo del FvW plasmático que puede incluir disminución de los multímeros de mayor tamaño (tipos 2A y 2B de la EvW) o cambios variables del Ag: FvW y la unión del factor VIII (tipos 2M y 2N de EvW).<sup>6</sup>

### 5.3 Características de los subtipos.

#### •Tipo 2A

Es el subtipo más frecuente dentro del tipo 2. Patrón de herencia más frecuente es autosómico dominante. Se describen dos posibles mecanismos en las mutaciones que muestran secreción alterada de multímeros de alto peso molecular, los que son debido a un defecto secundario en el transporte intracelular y por mutaciones con síntesis y secreción de FvW que probablemente son más susceptibles *in vivo* a la proteólisis.<sup>6</sup>

Los individuos con EvW de tipo 2 A carecen de multímeros de FvW de pesos moleculares intermedio y alto en plasma, hay al menos dos defectos observados: mayor sensibilidad a la proteólisis y secreción o transporte celular anormales.

Los sujetos de tipo 2 A tienen una tendencia hemorrágica moderadamente intensa.<sup>7</sup>

La mayoría de los casos de tipo 2A se deben a mutaciones de sentido erróneo en el dominio A2, R1597W, R1597Q, R1597Y y S1506L por alrededor de 60%.<sup>3,23</sup>

El propéptido de FvW tiene una vida media de 2-3 horas, mientras FvW maduro tiene una vida media de 8-12 horas.<sup>7</sup>

La sobrevida del FvW se reduce en pacientes con la mutación R1205H y otras mutaciones que ocurren en el dominio D3 (C1130F,C1130G, W1144G,C1149R, R1205H, R1205S, R 1205C), en el dominio A1 (I1416N), el dominio D4 (S2179F), dominio CK (C2671Y).<sup>7</sup>

Para investigar el origen de la enfermedad de von Willebrand en la población mestiza mexicana, se realizó el primer estudio molecular de un grupo mexicano que tiene una mezcla particular de genes indígenas, caucásicos y africanos. Se analizaron los exones 18, 19, 20, 28, 45 y 52 del gen del FvW de 34 casos de mexicanos mestizos. Se encontraron tres nuevas mutaciones: E1447Q en un paciente con diabetes tipo 1; P2781S en un paciente con tipo 2M, y P812L en otro paciente tipo 1/2N, la mutación G1609R fue la más frecuente (6/28) en pacientes con EvW tipo 2A.<sup>8</sup>

### •Tipo 2B.

La EvW tipo 2B que se caracteriza por un incremento en la afinidad del FvW por las plaquetas que conduce a un enlace espontáneo de grandes multímeros de FvW a las plaquetas *in vivo*, seguido por una depuración de ambos.<sup>3</sup>

Herencia principalmente autosómica dominante. El FvW tiene una mayor afinidad por el glucoreceptor Ib/IX/V, ocasionando unión del FvW plasmático a plaquetas acelerando la reducción del factor a multímeros más pequeños y con menor efectividad en la formación de trombos, por este motivo en algunos pacientes se asocia con la presencia de trombocitopenia leve crónica. La trombocitopenia puede agudizarse en estrés quirúrgico, infección o embarazo.<sup>3</sup>

La mayoría de los casos de tipo 2B se deben a mutaciones de sentido erróneo en el dominio A1 aproximadamente en 90%, siendo causado por mutaciones en R1306W, R1308C, V1316M y R1341Q, incrementan la capacidad de la adherencia del FvW al receptor plaquetario y causan interacciones espontáneas entre FvW y plaquetas en el torrente sanguíneo.<sup>6</sup>

Las personas con EvW de tipo 2B exhiben una mutación de ganancia de función en el FvW que propicia una mayor afinidad por la GPIb plaquetario. La mayor unión del FvW a las plaquetas causa una depuración selectiva y disminución de la cifra plasmática de multímeros de FvW de alto peso molecular e intermedio, a semejanza de la Enfermedad de tipo 2 A. Debido a la mayor afinidad del FvW por las plaquetas se observa una mayor tendencia a la aglutinación a bajas concentraciones de ristocetina en el análisis RIPA. En la práctica clínica, la unión de FvW-plaquetas excesiva puede llevar a la depuración de los trombocitos y trombocitopenia. El embarazo, la inflamación o la administración de DDAVP (desmopresina) pueden empeorar la trombocitopenia por aumento de la liberación de FvW. A pesar de la propensión a la agregación plaquetaria, estos individuos sufren una tendencia hemorrágica y no una enfermedad trombótica.<sup>7</sup> El diagnóstico se hace con agregometría en presencia de ristocetina, habitualmente con el empleo de RIPA que resulta incrementado. La relación entre FvW:RCo y

FvW:Ag a menudo baja y hay un déficit de multímeros de FvW de alto peso molecular en el plasma, porque estos se han ligado a las plaquetas.<sup>3</sup>

- **Tipo 2M**

EvW tipo 2M que incluye variantes en las cuales la adhesión plaquetaria está dañada pero se distingue por un patrón normal de multímeros de FvW en plasma, con una disminución desproporcionada de la actividad del FvW en comparación con las concentraciones de FvW:Ag consecuencia de una mutación en el sitio de unión de GP Ib de FvW que atenúa su afinidad por el receptor plaquetario, pero no la estructura multimérica y el ensamble del FvW.<sup>6,9</sup>

Algunas mutaciones heterogéneas son responsables de los casos de tipo 2M y están localizadas dentro del dominio A1 del FvW. Se pueden encontrar incluso multímeros más grandes (sugiriendo una alteración en la proteólisis). Este subtipo también puede ser ocasionado por la disminución de adhesión a colágena y no ser detectada por actividad de cofactor de ristocetina.<sup>3</sup>

- **Tipo 2N.**

Patrón de herencia autosómico recesivo. Existe disminución de afinidad del FvW con el FVIII por mutaciones en el dominio D' y D3.<sup>3</sup>

Mutaciones de sentido erróneo en el dominio de unión a FVIII en la porción amino-terminal de FvW son responsables del tipo 2N. La mutación R854Q es la más frecuente y se ha encontrado en aproximadamente el 2% de la población holandesa. Esta mutación puede causar síntomas sólo en estados homocigotas o heterocigotos compuestas.<sup>6</sup>

La identificación de la mutación tipo 2N, la cual se sospecha en el caso de una marcada reducción de FVIII en comparación con FvW, el subtipo es fenotípicamente identificado por la prueba de afinidad de unión FVIII/FvW circulante.<sup>3</sup>

La ausencia de los multímeros más grandes propicia un descenso desproporcionado de la actividad del FvW (actividad del cofactor ristocetina) en comparación con Ag:FvW. Es menos probable que la actividad del factor VIII esté



disminuida en los tipos 2 A, 2B y 2M de la EvW, pero se ve notoriamente afectada en la enfermedad de tipo 2N. <sup>6</sup>

La EvW tipo 2 N (Normandy) es resultado de una mutación en el sitio de unión del factor VIII del FvW, que da lugar a su débil unión.

La variante 2N o Normandy en la que distintas sustituciones de un solo aminoácido en el FvW maduro en las posiciones 19 (Arg → Trp), 22 (Gly → Glu), 28 (Thr → Met), 53 (Arg → Trp), 54 (His → Gln), 91 (Arg → Gln) (la más frecuente) y 24 (Glu → Lys), que están localizadas en el dominio D'y116 (Asp → Asn) en el dominio D3,21,22 dan como resultado una capacidad de enlace disminuida por el FVIII y provoca, por consiguiente, una disminución en grado variable del FVIII:C, con un patrón de laboratorio indistinguible de la hemofilia A leve o moderada y similar también a algunas formas de EvW tipo 1.<sup>10</sup> Las determinaciones de la actividad de FvW y el antígeno son normales, al igual que el análisis de multímeros de FvW. El grado de actividad del factor VIII está disminuido, a semejanza de lo que ocurre en la hemofilia A leve. El defecto se encuentra en la región N-terminal del FvW donde el dominio de unión para el factor VIII reside. <sup>6</sup>

También hay pacientes que se diagnostican erróneamente como EvW tipo 1 con actividad de FvW entre 35 y 50 % normal, mientras que la actividad del FVIII:C se encuentra desproporcionadamente disminuida y puede tratarse de EvW 2N. <sup>10</sup>

#### **5.4 Enfermedad Von Willebrand tipo 3.**

Patrón de herencia autosómico recesivo, los padres casi nunca presentan diátesis hemorrágica, lo que sugiere de forma adicional un patrón de herencia autosómico recesivo. Se conoce por una virtual ausencia de Ag:FvW circulante y grados muy bajos de actividad de FvW y del Factor VIII (3 a 10% de lo normal). Estos pacientes experimentan pérdida sanguínea grave, con hemorragia de mucosas, hemartrosis y hematomas musculares, como en el caso de las hemofilias A o B. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede en la hemofilia típica, sus tiempos de sangría son muy prolongados. El genotipo de la enfermedad de tipo 3 aún no se define.<sup>3,9</sup>

La sobrevida del FvW disminuye en pacientes con la mutación R1205H y otras mutaciones que ocurren en el dominio D3 del FvW están relacionadas con la eliminación acelerada del FvW.<sup>7</sup>

**Cuadro 2.** Tipos de Enfermedad de von Willebrand.

<b>DEFICIENCIA CUANTITATIVA DEL FvW</b>
<b>Tipo 1: Deficiencia parcial cuantitativa del FvW.</b>
<b>Tipo 3: Deficiencia completa del FvW</b>
<b>DEFICIENCIA CUALITATIVA DEL FvW</b>
<b>Tipo 2: Deficiencia cualitativa del FvW</b>
<b>Tipo 2A: Variantes cualitativas con disminución de la función plaquetaria – dependiente asociada con la ausencia de multímeros de FvW de alto peso molecular.</b>
<b>Tipo 2B: Variantes cualitativas con incremento de la afinidad por las plaquetas GPIb.</b>
<b>Tipo 2M: Variantes cualitativas con disminución de la función plaquetaria dependiente, no causada por la ausencia de multímeros FvW de alto peso molecular.</b>
<b>Tipo 2N: Variantes cualitativas con marcada disminución de la afinidad por el Factor VIII.</b>

*Tomado de Hillman RS. 2006 .<sup>9</sup>*

### **5.5 Criterios clínicos para la evaluación de la historia de sangrado.**

El sangrado cutáneo y el sangrado después de la extracción dental deben ser considerados como los síntomas más sensibles. Se ha propuesto que las pruebas de laboratorio para la enfermedad de von Willebrand deben ser realizadas en sujetos con al menos tres síntomas de sangrado menor o con al menos dos síntomas mayores, si incluyen el sangrado cutáneo o el sangrado después de la extracción dental.<sup>6</sup> Cuadro 3

Un ejemplo propuesto para registro de sangrado es basado en la severidad progresiva de los síntomas individuales. Se estableció de manera arbitraria, es decir, sin un sistema de validación para cada uno de los grados, pero tiene la virtud de permitir incrementar la sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la EvW, además en pacientes pediátricos hay publicaciones en las que se valida dicha escala concluyendo que es sensible y específica para diagnosticar EvW, tomando como punto de corte al menos dos síntomas diferentes y más de tres a cinco puntos, con una sensibilidad 64.2% y especificidad de 99.1%, es decir que la posibilidad de tener el diagnóstico de EvW se incrementa cuando conjuntamos variables cualitativas y cuantitativas, síntomas de hemorragia con magnitud de la misma.<sup>6</sup>

**Cuadro 3.** Criterios para calcular el sangrado en pacientes con EvW.

<b>CALIFICACION</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>TIPO DE SANGRADO</b>				
<b>EPISTAXIS</b>	AUSENTE	<10 episodios/año No terapia	>10 episodios/año. No terapia o terapia local	DDAVP O CONCENTRAD O FVIII/ FvW
<b>SANGRADO CUTANEO</b>	AUSENTE	<10 episodios/año No terapia	>10 episodios/año. No terapia o terapia local	DDAVP O CONCENTRAD O FVIII/ FvW
<b>SANGRADO DE HERIDAS MENORES</b>	AUSENTE	<10 episodios/año No terapia	>10 episodios/año. No terapia o terapia local	DDAVP O CONCENTRAD O FVIII/ FvW
<b>SANGRADO DE LA CAVIDAD ORAL</b>	AUSENTE	Después de mínimo trauma. No terapia.	Espontanea. No terapia o terapia local	DDAVP O CONCENTRAD O FVIII/ FvW
<b>SANGRADO</b>	AUSENTE	1 episodio.	>1episodio de	DDAVP O

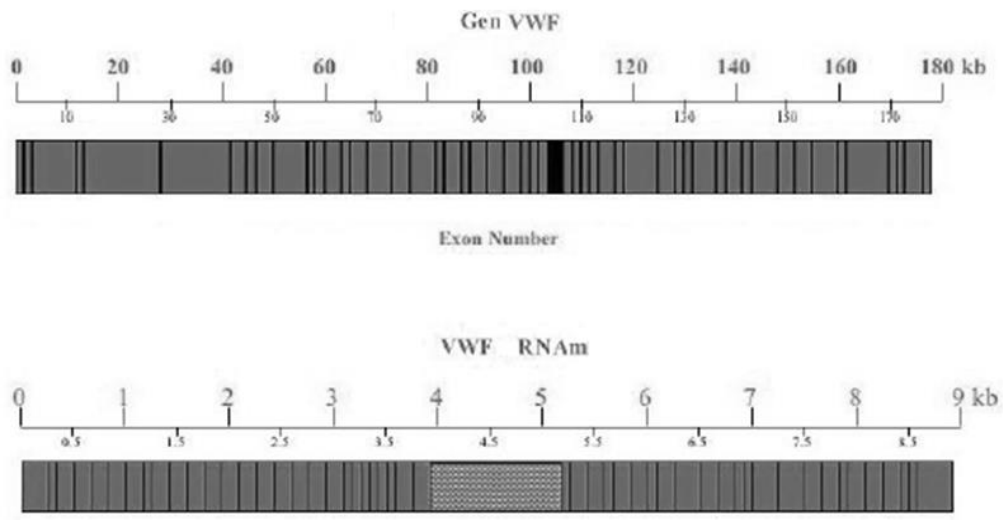
<b>GASTROINTESTINAL</b>		No terapia	sangrado. No terapia o terapia local.	CONCENTRAD O FVIII/ FvW
<b>SANGRADO DE EXTRACCION DENTAL</b>	AUSENTE	Algunas veces. Sin terapia o terapia local	Siempre. Terapia local.	DDAVP O CONCENTRAD O FVIII/ FvW
<b>SANGRADO DESPUES DE CIRUGIA</b>	AUSENTE	Sangrado menor. Sin terapia o terapia local	Sangrado mayor. Terapia local	DDAVP O CONCENTRAD O FVIII/ FvW
<b>HEMORRAGIA POSTPARTO</b>	AUSENTE	Sangrado menor. Sin terapia o terapia local	Sangrado mayor. Terapia local	DDAVP O CONCENTRAD O FVIII/ FvW
<b>HEMATOMAS MUSCULARES</b>	AUSENTE	Después de trauma mayor. No terapia	Después de trauma menor. No terapia o terapia local	DDAVP O CONCENTRAD O FVIII/ FvW
<b>HEMARTROSIS</b>	AUSENTE	Después de trauma mayor. No terapia.	Después de trauma menor. Terapia local.	DDAVP O CONCENTRAD O FVIII/ FvW
<b>MENORRAGIA</b>	AUSENTE	Sin terapia o terapia local	Píldoras anticonceptivas	DDAVP O CONCENTRAD O FVIII/ FvW
<b>REGISTRO TOTAL</b>				

CALIF. Calificación. DDAVP desmopresina. Federici AB. 2004.<sup>6</sup>

## 6. Fisiología y aspectos moleculares de la enfermedad de Von Willebrand.

### 6.1 Gen del factor de Von Willebrand

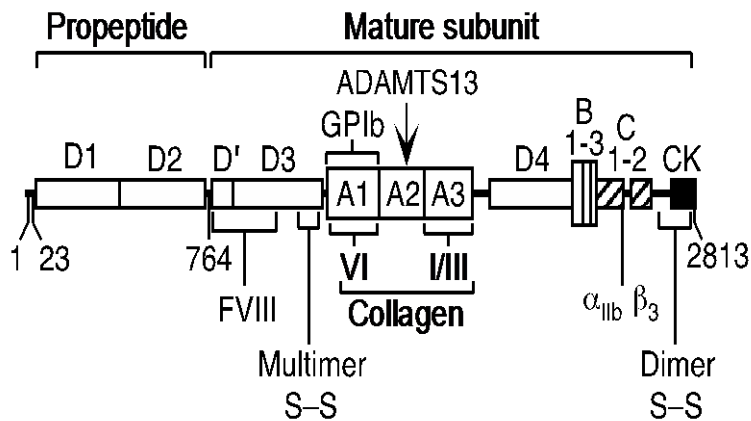
El gen del FvW está localizado en el brazo corto del cromosoma 12 en el p13.3, abarca 178 Kilobases (Kb) y constituye 52 exones cuyo tamaño oscila entre 1.3 kb (exón 28) y 40 pares de bases (pb) (exón 50). El RNAm codificado del FvW tiene 9 kb de longitud y la molécula traducida pre-pro-FvW contiene 2,813 aminoácidos (AA) y una subunidad madura secretora de 2,050 AA que posee todos los puntos de unión para la función hemostática del FvW.<sup>1</sup> Figura 1.



**Figura 1.** Estructura del gen FvW. Tomado de base de datos de FvW la Universidad de Sheffield

Los multímeros de FvW se ensamblan a partir de subunidades idénticas. El precursor preproFvW contiene cinco tipos de dominios estructurales en el orden D1-D2- D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-CK. El prepro FvW consiste en un péptido señal (residuos 1 a 22), propéptido (23 - 763) y la subunidad madura (764-2,813). Las ubicaciones están indicadas para dominios estructurales (A, B, C, D, CK), intersubunidades de puentes de disulfuro (S - S), sitio de escisión del ADAMST-13 (FvW dependiente de la adhesión de plaquetas está regulada por ADAMTS-13, una metaloproteasa que corta un enlace específico , Tyr-Met en la

subunidad de FvW, parece que la reducción de la supervivencia de FvW es modulada por la actividad de ADAMTS-1 y los sitios de unión para el factor VIII, la glucoproteína plaquetaria Ib (GPIb), integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , y colágena tipo I, III y VI.<sup>11</sup>Figura 2.

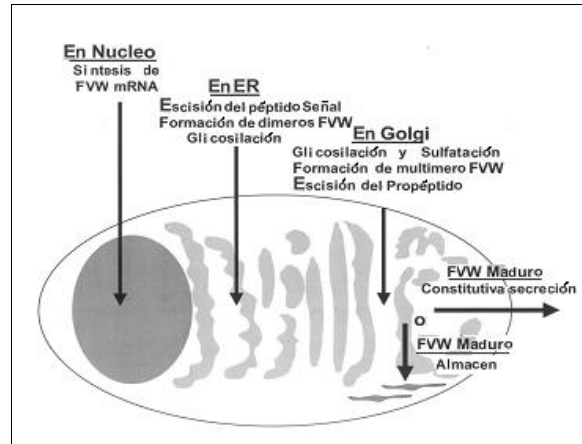


**Figura 2.** Estructura del FvW. Sadler JE. 2009.11

El mecanismo de montaje del multímero de FvW implica la dimerización en el retículo endoplásmico y multimerización en el aparato de Golgi. La clave para el montaje del multímero es la región N-terminal D1-D2-D'-D3 del proFvW.<sup>12</sup>

Se ha encontrado que el propéptido de FvW y el dominio D3 de la subunidad de FvW forma un intercadena intermedia unido por puentes disulfuro en el retículo endoplásmico que reorganiza en el aparato de Golgi para producir subunidades de FvW unidos por enlaces disulfuro entre cadenas.<sup>12</sup>

El almacenamiento tubular de multímeros del FvW es crítico para la hemostasia.<sup>1,12</sup> Figura 3.

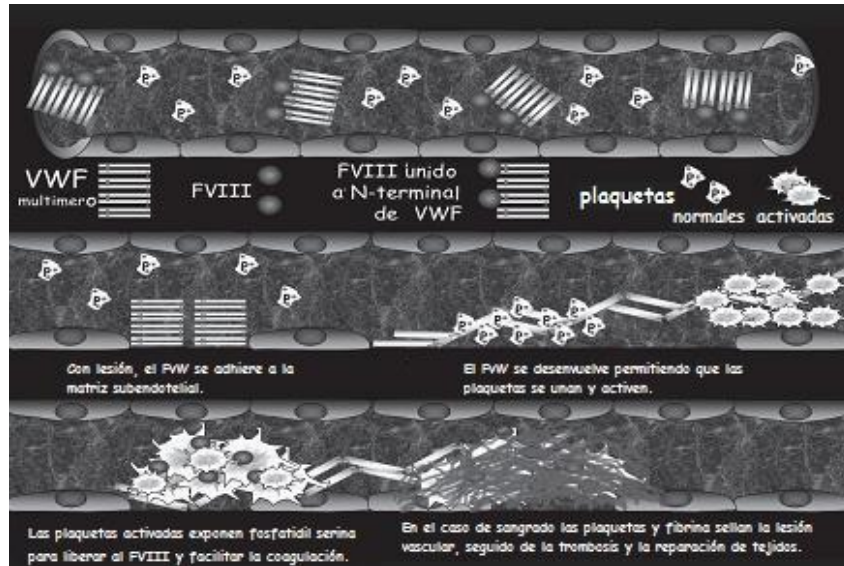


**Figura 3.** Síntesis, procesamiento intracelular y secreción del FvW

. Lillicrap D, World Federation Hemophilia, 2008.<sup>1</sup>

El propéptido de FvW parece funcionar como sensor de pH y controlar la formación de enlaces disulfuro, necesarios para el ensamblaje de las proteínas multiméricas en el aparato de Golgi, la condensación de carga secretora, la biogénesis de orgánulos derivados de los compartimentos de Golgi y la regulación de la adhesión plaquetaria.<sup>12</sup>

El fibrinógeno y el FvW son indispensables para la adhesión, agregación y formación de coágulos por las plaquetas. Se requiere FvW para la adhesión inicial de las plaquetas, al tejido conectivo subendotelial, que forma un puente de colágena con el receptor de superficie GPIb del trombocito. El fibrinógeno y el FvW funcionan como cofactores en la agregación plaquetaria al interactuar con los receptores GPIb y GPIIb/IIIa. <sup>9</sup> Figura 4



**Figura 4.** Función hemostática del FvW a través de las interacciones con componentes plasmáticos, endoteliales y plaquetarios. Tomado de Nichols, Haemophilia, 2008.

Las células endoteliales parecen ser la fuente primaria del FvW plasmático (pueden ser liberados por el estrés o fármacos tales como la desmopresina (1-desamino-8-D-arginina, DDAVP), un análogo sintético de la vasopresina).<sup>1</sup>

El FvW es también sintetizado en megacariocitos de médula ósea, donde se almacena en los gránulos alfa de las plaquetas, de donde se libera después de la activación plaquetaria.<sup>7</sup> En los megacariocitos se sintetiza como una subunidad proteica que experimenta una compleja serie de modificaciones postranslacionales, como dimerización, glucosilación, sulfatación y a la larga multimerización.<sup>1</sup>

De manera inicial se produce un polipéptido y se almacena como dímero en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales. A continuación se retira una porción del péptido y los dímeros se enlazan por puentes de sulfuro para formar multímeros de diversos tamaños. Estas formas múltiples se liberan a la circulación, con un peso molecular que oscila entre 500 y 20,000 kd y más de 2µm de longitud, donde sirven como cofactores en la adhesión o agregación



plaquetarias y como portadores del factor VIII. Esto último es importante para determinar la tasa de depuración del factor VIII de la circulación.<sup>9</sup>

El FvW se une al complejo GPIIb/IIIa para impulsar la agregación plaquetaria en colaboración con el fibrinógeno<sup>9</sup>

Tras la secreción, los multímeros del FvW de alto peso molecular (APM) experimentan una proteólisis parcial mediada por la proteasa plasmática ADAMTS-13, fragmentándose en el dominio A2 de la proteína del FvW entre los residuos del AA tirosina 1605 y metionina 1606.<sup>1</sup>

## **6.2 Proteína de FvW**

El FvW es una proteína multifuncional adherente que posee importantes funciones en la hemostasia, entre los que se encuentran:<sup>5</sup>

1.- Papel fundamental en los estadios celulares iniciales del proceso hemostático. El FvW se fija al complejo receptor glucoproteico plaquetario (GP) Ib/IX para iniciar la adherencia plaquetaria al subendotelio. Tras la adherencia, la activación plaquetaria ocasiona la exposición del receptor integrina GPIIb/IIIa a través del cual el FvW y el fibrinógeno median la agregación plaquetaria.

2.- Es una proteína transportadora del cofactor procoagulante FVIII. El FvW se fija al FVIII y lo estabiliza; en consecuencia, niveles bajos de FvW o una fijación defectuosa del FvW al FVIII disminuye los niveles del FVIII debido a que la proteína C activada acelera su degradación proteolítica.<sup>5</sup>

## **6.3 Interacción de FvW con FVIII**

El complejo FVIII-vWF juega un papel crítico en la regulación de las respuestas tanto de plaquetas y la coagulación normal. El FVIII se une al vWF dentro de los primeros 272 residuos de la región N-terminal del FvW maduro (En los dominios D y D3 correspondiente a los residuos 763 a 1,035). La escisión del propéptido del polipéptido maduro se requiere para la unión de FVIII, sin embargo, la previa intervención del propéptido maduro en el procesamiento FvW aumenta la afinidad posterior de FvW de FVIII por aproximadamente 10 veces.<sup>13,14</sup> La interacción entre el vWF con la cadena ligera de FVIII sirve para aumentar la tasa de asociación de

la cadena pesada y las cadenas ligeras de FVIII.<sup>15</sup> Sin embargo FVIII se puede activar y / o inactivados por un número de proteasas de serina relacionadas con la coagulación, incluyendo FXa, APC y FIXa. La importancia fisiológica de estas reacciones no está claro, sin embargo la unión de FVIII a vWF lo protege contra la escisión por estas proteasas con la excepción de la trombina.<sup>16</sup> Esta protección está mediada por dos mecanismos primer lugar, FvW enlazado a FVIII es incapaz de unirse a fosfolípidos o plaquetas<sup>17</sup>, segundo, la unión directa a los sitios de proteasa en la cadena ligera de FVIII está oculta, cuando FVIII está en complejo con FvW. Esta protección de la proteólisis sirve para aumentar la vida media del FVIII.<sup>18,19</sup>

#### **6.4 Factores que intervienen en la expresividad del fenotipo de la EvW**

Existe una compleja relación entre el genotipo y fenotipo de la EvW. Se ha demostrado que algunas mutaciones tienen efectos pleiotrópicos sobre la función o estructura del FvW y en algunas personas la mutación que ocasiona la enfermedad comprende una mutación en estado heterocigoto compuesto con dos alelos mutantes que causan EvW por diferentes mecanismos, produciendo alteraciones fenotípicas complejas, aunado a que la penetrancia de la enfermedad es incompleta, y por ende dificulta su categorización.<sup>4</sup>

Los niveles plasmáticos del FvW se modulan por distintos factores fisiológicos, incidiendo en la gran heterogeneidad observada en la presentación clínica.<sup>4</sup>

##### **6.4.1 Grupo sanguíneo y factor de Von Willebrand**

Además del propio gen FvW (12p13.2), está bien establecido que otros locus ejercen importantes efectos cuantitativos sobre los niveles plasmáticos de FvW. El más importante es el locus de grupo sanguíneo ABO en el cromosoma 9q34.<sup>20</sup>

Las personas del grupo sanguíneo "O" tienen niveles de FvW 20 a 25% menores que los observados en personas de grupos sanguíneos "no O".<sup>21</sup> El papel de este mecanismo de protección podría explicar los bajos niveles de FvW en los sujetos del grupo O.<sup>7</sup> Cuadro 4.

**Cuadro 4.** Influencia del grupo sanguíneo ABO en los niveles del FvW:Ag

GRUPO ABO	FvW:Ag Media (UI/dL)	Rango
O	74.8	35.6 - 157.0
A	105.9	48.0 - 233.9
B	116.9	56.8 - 241.0
AB	123.3	63.8 - 238.2

Tomado de Carlos Martínez Murillo., Guía rápida de EvW, 2011.4

El FvW es una de las pocas proteínas no eritrocíticas que expresan antígenos A, B, O. Los Oligosacáridos A,B,H han sido identificados en las cadenas de oligosacáridos N-enlazados del FvW ubicados en el dominio A1, que contiene el sitio de unión de la glicoproteína Ib a plaquetas (GPIb).<sup>22</sup>

La estructura de los hidratos de carbono protege de la degradación proteolítica al FvW en el plasma, los datos de la literatura recientes muestran que una reducción en el número de azúcares en las cadenas de oligosacáridos de FvW se asocia con un aumento en la susceptibilidad a la escisión por ADAMTS13.<sup>23,24</sup> De hecho, el fenotipo Bombay se asocia con una mayor susceptibilidad a la proteólisis por ADAMTS13 siendo correspondiente a individuos homocigotos recesivos el gen H, por la cual no puede modificarse la molécula precursora H y no presenta ninguno de los antígenos de membrana A, B o H en eritrocitos.<sup>25</sup>

El mecanismo patogénico por el cual el grupo sanguíneo ABO influye en la susceptibilidad a la escisión por ADAMTS13 es todavía desconocida, pero dos sitios de N-glicosilación potenciales (asparaginas 1515 y 1574) se encuentran en las proximidades del sitio de corte ADAMTS13 (Tyr1605-Met1606 enlace del dominio A2). Así, la composición de la cadena de oligosacárido puede estar

implicada en la estabilización de la conformación de esta región en el FvW, de tal manera que la ausencia de azúcar terminal permite el dominio A2 a adoptar una conformación más permisiva para la escisión por ADAMTS13 y con ello acelerar la degradación del FvW circulante en plasma.<sup>25</sup>

## **7. Diagnóstico.**

Se han identificado tres grados de severidad de la EvW de acuerdo a los niveles de actividad de FVIII/FvW: severa, moderada y leve. Las formas más severas: Tipo 1, 2A, 2M y 3, con niveles de FvW:RCo (actividad del cofactor de ristocetina) <10 U dL<sup>-1</sup> y/o FVIII:C <20 U dL<sup>-1</sup>.

Las formas moderadas de la EvW : Tipo 1, 2B, 2M, 2N con niveles de FvW:RCo 10-30 U dL<sup>-1</sup> y/o FVIII:C 20-40 U dL<sup>-1</sup>.

Las formas leves FvW:RCo 30-50 U dL<sup>-1</sup> y/o FVIII:C 40-60 U dL<sup>-1</sup> son descritas en la porción media y en la base de la pirámide.

Debido a los cambios fisiológicos del FvW y la variabilidad de las pruebas, una muy leve forma de EvW (FvW:Rco y/o FVIII:C > 40 U dL<sup>-1</sup>) puede ser diagnosticada solo cuando esos niveles bajos de actividad del FVIII/FvW son asociados con historia de sangrado personal y familiar.<sup>6</sup>

Por lo tanto, si se tienen niveles bajos de FvW: Rco o FVIII: C, mayor es la probabilidad de un diagnóstico de la EvW, en este sentido, las formas severas EvW podrían representar la "punta del iceberg" de un gran número de moderados y leves defectos de FvW.<sup>6</sup>

Inicialmente se debe tener una sospecha del diagnóstico fundamentada en:

1.- Historia de sangrado desde la infancia 2.- Historia familiar de sangrado (con patrón de herencia autosómico dominante o autosómico recesivo), 3.- Actividad del FvW: RiCo en plasma.<sup>3</sup>

Si el paciente cumple con criterios clínicos que hagan sospechar la existencia de la enfermedad se deben solicitar los estudios de primera fase que son:

determinación del tiempo de sangrado, cuenta de plaquetas, tiempos de coagulación y especialmente la determinación de FvW:Ag, FvW:RiCo y FVIII:C.<sup>3,4</sup>

Se recomienda seguir el siguiente proceso con las pruebas de laboratorio:

1. Cantidad de FvW:Ag del paciente, cifras menores a 1 UI/dL es diagnóstica de tipo 3. Si es mayor pasamos al paso 2.
2. Se divide la actividad del FvW:RiCo entre el FvW:Ag. Si el resultado es mayor a 0.6 es tipo 1. Si la relación es menor a 0.6 debe pensarse en tipo 2. Esto significa que en el tipo 1 la actividad del factor está ligada a la cantidad de factor presente, a diferencia del tipo 2 que no existe esta relación lineal.
3. Se divide la actividad de FVIII:C entre el FvW:Ag, si la relación es menor a 1 es probable se trate de un tipo 2N, debe corroborarse con el test de afinidad de FVIII:C con FvW. Cuadro 5.

Si posterior a esta primera fase se sospecha un tipo 2 deben realizarse los siguientes laboratorios:

- Agregometría plaquetaria con ristocetina o prueba RIPA(Agregación Plaquetaria Inducida por Ristocetina)
  - Electroforesis de alta resolución de multímeros de FvW.
4. La agregometría plaquetaria nos indica la concentración de ristocetina necesaria para lograr agregación de 30% de plaquetas. Los subtipos 2A y 2M presentan poca respuesta de agregación requiriendo niveles superiores a 1.2 mg/mL. El subtipo 2B al presentar mayor afinidad por las plaquetas agrega cantidades menores a 0.8 mg/mL permitiendo así su identificación.
  5. El análisis de multímeros del FvW permite diferenciar el tipo 2M con multímeros normales, del subtipo 2A que carece de multímeros de alto peso molecular.<sup>3</sup>

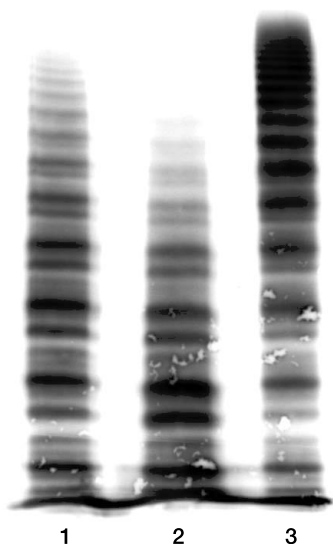
**Cuadro 5. Criterios de laboratorio en EvW.**

TIPO EvW	FvW:RCo (IU dL <sup>-1</sup> )	FvW:Ag(IU dL <sup>-1</sup> )	FVIII	Índice FvW:RCo/FvW:Ag
1	<30*	<30*	↓ o normal	>0.5 a 0.7
2 <sup>a</sup>	<30*	<30-200*‡	↓ o normal	<0.5 a 0.7
2B	<30*	<30-200*‡	↓ o normal	Usualmente <0.5 a 0.7
2M	<30*	<30-200*‡	↓ o normal	<0.5 a 0.7
2N	30-200	30-200	↓↓	>0.5 a 0.7
3	<3	<3	↓↓↓ (<10 IU dL <sup>-1</sup> )	No aplicable
FvW Bajo	30-50	30-50	Normal	>0.5 a 0.7
Normal	50-200	50-200	Normal	>0.5 a 0.7

\*Menos de 30 IU dL<sup>-1</sup> es designado como el nivel para un diagnóstico definitivo de EvW. ‡ El FvW:Ag en la mayoría de los individuos con tipo 2A, 2B o 2M de EvW es <50 IU dL<sup>-1</sup>. Nichols WL. 2008.<sup>4</sup>

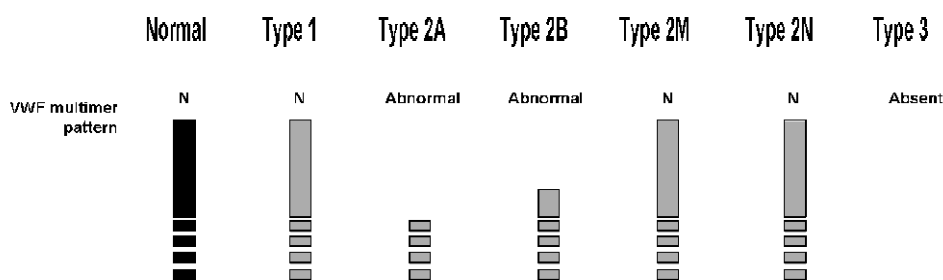
### 7.1 Análisis de multímeros del factor de Von Willebrand.

Es el estándar de oro para el diagnóstico de la enfermedad, permite la definición de las variantes cuantitativas y las cualitativas 2A y 2B, ya que para las variantes cualitativas 2M y 2N, los resultados se complementan con las pruebas de función del FvW. El principio del análisis de multimeros es la separación electroforetica de multimeros de FvW en gel de SDS (sodium dodecyl sulphate)/agarosa basado en su peso molecular, seguido de visualización no radioactiva usando un sistema de anticuerpos conjugados alcalino fosfatados.<sup>21,26</sup> Figura 5 y 6.



**Figura 5.** Ejemplo de multímeros en gel. Kitchen S. 2001.<sup>26</sup>

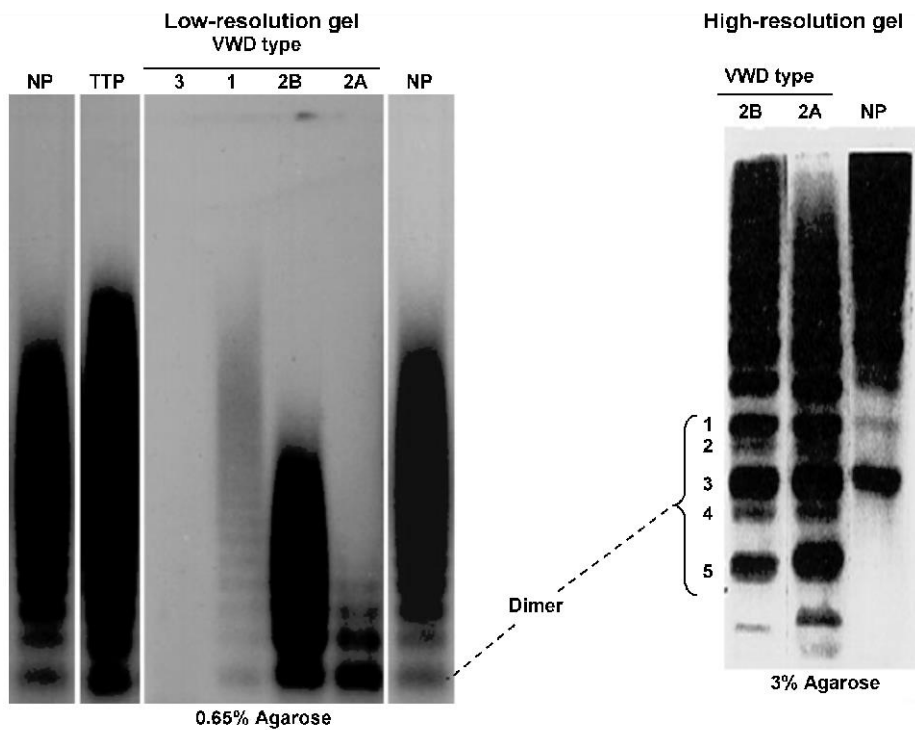
Nota: Las formas de FvW de peso molecular más alto están en la parte superior de la columna. Columna 1 paciente con EvW tipo 2B, columna 2 paciente con EvW tipo 2A, columna 3 plasma normal con todos los multímeros intactos.



**Figura 6.** Análisis de multímeros de FvW. Nichols WL, 2008. <sup>4</sup>

Los geles de baja resolución (agarosa 0.65%) demuestran el cambio en la distribución de multímeros grandes en la parte superior del gel, mientras que los geles de alta resolución (agarosa 2-3%) pueden separar cada multímero dentro de varias bandas que pueden ser distinguidas. El gel de agarosa al 3% falla para demostrar la pérdida de multímeros de alto peso molecular vistos en la parte superior del gel 0.65%. EvW 1 tiene todos los tamaños de multímeros, pero

disminuidos en concentración. EvW 2A pierde los multímeros grandes e intermedios. EvW 3 no se identifican multímeros.<sup>4</sup> Cuadro 6 y Figura 7.



**Figura 7.** Análisis de los multímeros del FvW. Nichols WL, 2008.<sup>4</sup>

**Cuadro 6.** Interpretación del patrón de multímeros.

PATRON DE MULTIMEROS	INTERPRETACION
Multímeros de todos los pesos moleculares presentes.	Patrón cualitativamente normal
Formación exagerada de tripletes de LMW	Reducción de HMWM
Marcada depleción de multímeros de HMW	Discreto incremento de HMWM
Incremento en las primeras bandas de LMW	Discreta disminución de HMWM
Multímeros no visibles	Multímeros no detectados

HMW multímeros de alto peso molecular, LMW multimeros de bajo peso molecular. Kitchen S. 2010.<sup>25</sup>



Se muestran los diferentes subtipos de la EvW los valores de laboratorio de cada uno de estos y el patrón de multímeros. Figura 8.

	Normal	Tipo 1	Tipo 2A	Tipo 2B	Tipo 2M	Tipo 2N	Tipo 3	PLT-VWD*
VWF:Ag	N	L, ↓ o ↓↓	↓ o L	↓ o L	↓ o L	No L	ausente	↓ o L
VWF:RCo	N	L, ↓ o ↓↓	↓↓ o ↓↓↓	↓↓	↓↓	No L	ausente	↓↓
FVIII	N	No ↓	No ↓	No ↓	No ↓	↓↓	1-9 IU/dL	No L
RIPA	N	N Frecuente	↓	N Frecuente	↓	N	ausente	N Frecuente
LD-RIPA	ausente	ausente	ausente	↑↑↑	ausente	ausente	ausente	↑↑↑
PFA-100® CT	N	No ↑	↑	↑	↑	N	↑↑↑	↑
BT	N	No ↑	↑	↑	↑	N	↑↑↑	↑
conteo de Plaquetas	N	N	N	↓ o N	N	N	N	↓
patrón de multímeros de FvW	N	N	anormal	anormal	N	N	ausente	anormal

**Figura 8.** Espectro de valores de laboratorio en los diferentes tipos de EvW.

Tomado de Nichols, Haemophilia, 2008.<sup>4</sup>

## 8. Tratamiento.

Antes del tratamiento, todas las personas sospechosas de EvW deben tener un diagnóstico por laboratorio del tipo y la gravedad de la enfermedad.

El tratamiento del paciente con EvW consiste fundamentalmente en incrementar las concentraciones del FvW y FVIII:C, esto a efecto de detener la hemorragia que puede ser ocasionada por defectos en la concentración del FvW en su parte funcional, denominado por su determinación en el laboratorio de hemostasia, cofactor de ristocetina (FvW:RiCo) o defectos en el FVIII:C. La elevación del FvW:RiCo y FVIII:C en los pacientes con EvW se puede lograr terapéuticamente mediante varios productos biológicos que incluyen; desmopresina (DDAVP) concentrados de factores de coagulación que contengan FvW/FVIII.<sup>3,27</sup>

A partir de la clasificación de la entidad pueden usarse alternativas de tratamiento y evitar los hemoderivados dado el riesgo que implican las transfusiones. No obstante, en términos generales, el tratamiento puede dividirse en dos tipos: terapias coadyuvantes para proporcionar un beneficio hemostático indirecto y tratamientos que incrementan las concentraciones plasmáticas de FvW y FVIII.<sup>3</sup>

Las terapias coadyuvantes pueden usarse con importantes beneficios particularmente en situaciones como cirugías menores así como para el tratamiento de la menorragia. Estas terapias incluyen el uso de medicamentos antifibrinolíticos (ácido tranexámico y ácido epsilon aminocaproico).<sup>27</sup>

Entre los tratamientos que incrementan las concentraciones plasmáticas de factor Von Willebrand y factor VIII, de manera aguda, se destacan dos ampliamente utilizados: la administración parenteral o nasal de desmopresina (desmopresina-1-deamino-8-p-arginina-vasopresina) y la terapia transfusional con concentrados de factor VIII/FvW derivados de plasma.

El tratamiento de elección en la actualidad es la desmopresina. Es un fármaco análogo sintético de la hormona antidiurética que genera la liberación del FvW desde los depósitos del endotelio, aumentando los niveles de FvW 2 a 5 veces su valor basal 45 minutos luego de su administración intravenosa y por 6 a 8 horas posteriores a su administración.<sup>27</sup>

La DDAVP se administra en dosis de 0,3 µg/kg mediante una infusión lenta (diluida en 50 ml suero salino 0,9%) durante 15-30 minutos. Su efecto pico se logra a los 15-30 minutos tras su infusión; se debe evitar la hiperhidratación por la posibilidad de retención hidrosalina dado que la ADDAVP reduce la eliminación de agua libre con la eventual producción de hiponatremia.<sup>9,27</sup>

La DDAVP desempeña un papel significativo en la prevención y/o tratamiento de episodios hemorrágicos en algunas pacientes con FvW tipo 1 debido a que puede elevar los niveles plasmáticos de FvW y factor VIII en la sangre. No es útil para el

tratamiento de otros tipos de FvW. Por ejemplo no es eficaz para el tratamiento de pacientes con enfermedad tipo 3 e incluso podría exacerbar la trombocitopenia que suele presentarse en pacientes con enfermedad tipo 2B.

El tipo 3 puede ser tratado con concentrados de factor VIII/FvW aunque se pueden desarrollar inhibidores, por lo que el tratamiento puede hacerse con factor VIIr (es un factor sintético de la coagulación que reduce el sangrado al interactuar en el sitio dañado con el factor tisular para estimular la generación de trombina y la formación del coágulo estable de fibrina), a razón de 90 a 120 µg/kg cada 2 a 3 horas por dos o tres dosis con buena respuesta, continuando con la misma dosis cada 4 horas, 6 horas y 12 horas en los tres días consecutivos. En las pacientes con FvW en quienes la DDAVP no sea eficaz o esté contraindicada, en casos en los que se anticipa un riesgo de hemorragia elevado o cuando la duración del apoyo hemostático requerido sea mayor a 3 días.<sup>27</sup>

El manejo de las hemorragias anormales por enfermedad de Von Willebrand se controla con acetato de desmopresina en aerosol nasal en cada fosa por 2 a 3 tres días durante la menstruación, asociado a coadyuvantes como anticonceptivos orales.<sup>27</sup>

El reemplazo del factor Von Willebrand mediante la infusión de crioprecipitado (contiene 40-70 UI de factor Von Willebrand, 80-120 UI de FVIII, 20-30 U/unidad de FXIII, 150-250 mg/dL de fibrinógeno y además 30-50 mg de fibronectina por unidad) controla o previene el sangrado en los tipos 1 y 2 de la enfermedad de Von Willebrand; pero existe un concentrado pasteurizado purificado- intermedio de factor VIII que contiene multímeros grandes de factor Von Willebrand, que evita los riesgos de la transfusión, por lo tanto, es una alternativa segura al crioprecipitado.<sup>9,27</sup>

La mayoría de las intervenciones quirúrgicas menores y hemorragias postraumáticas fueron cubiertos satisfactoriamente con DDAVP, mientras que la cirugía mayor, incluyendo cirugía cardíaca, se manejó con facilidad con

concentrados de FvW/FVIII . A pesar de que los resultados no han sido comparados con los de los pacientes con la supervivencia normal de FvW, parece que la tendencia a la hemorragia en este gran grupo de pacientes con la supervivencia del FvW no es significativamente diferente. Además, a pesar de la corta vida media después de la infusión FVIII y FvW, la mayoría de las situaciones clínicas puede tratarse con éxito con DDAVP, como ocurre generalmente para otro tipo pacientes con EvW. Se necesitan más estudios para aclarar definitivamente si, en determinadas circunstancias clínicas estos pacientes requieren un enfoque diferente de la de tipo 1 clásico.<sup>27</sup>

#### **9. Estudios previos al proyecto en pacientes pediátricos con sospecha de EVW en la UMAE PEDIATRIA DEL CMNO, IMSS.**

Se han realizado dos estudios transversales en pacientes pediátricos con sospecha de Enfermedad de von Willebrand en el centro médico nacional de occidente, UMAE PEDIATRIA.

El primero titulado “Diagnóstico molecular de la enfermedad de von Willebrand en pacientes del hospital de pediatría CMNO IMSS” , cuyo objetivo fue determinar la correlación clínico – laboratorial de cada uno de los tipos de EvW en la población del Hospital de Pediatría, se estudiaron un total de 25 pacientes; en la que el 36% (9 pacientes ) tuvieron EvW tipo 1, 32 % (2) con EvW tipo 2, 28% (7) normales y 1 paciente tuvo otro diagnostico diferente a la patología estudiada. Se concluyó que existe una correlación clínica y de laboratorio estadísticamente significativa y válida para un diagnóstico inicial en pacientes con sospecha de EvW, con base en los estudios de laboratorio confirmatorios iniciales. Además que es necesario la confirmación de esta patología por análisis de multímeros.<sup>28.</sup>

Posteriormente se realizó un nuevo proyecto,” Diagnóstico molecular por análisis de multímeros de la enfermedad von Willebrand en pacientes del Hospital de Pediatría del CMNO” cuyo objetivo fue describir el diagnóstico molecular por análisis de multímeros de la enfermedad von Willebrand en pacientes pediátrico. Se incluyeron 30 pacientes, y se hicieron 4 confirmaciones diagnosticas con análisis de multímeros, reportándose en tres pacientes con una variante tipo 2,

con esto se concluyó que la relación que existe entre el cuadro clínico, la actividad y el antígeno del FvW pueden identificar en una primera fase, las formas cualitativas de las cuantitativas de la enfermedad de von Willebrand, y quizás en muchos casos en los que esté muy clara esta correlación clínica y de laboratorio, pudieran manejarse como tales, pero es imprescindible la confirmación mediante estudio de multímeros para poder esclarecer con precisión el tipo de enfermedad de von Willebrand y es de importancia considerar el tipo sanguíneo de los pacientes para ponderación de los resultados.<sup>29</sup>

Un estudio publicado en el año del 2012, por Majluf –Cruz y cols., donde se realizó una cohorte de pacientes mexicanos con historia de sangrado crónico incluyendo a pacientes pediátricos y adultos. Fueron reclutados mestizos mexicanos entre julio del 2010 y agosto 2011. Se incluyeron 133 pacientes con sospecha de von Willebrand. Dentro de los estudios de escrutinios se incluyó la biometría hemática completa, grupo sanguíneo, tiempo de sangrado, TP, TTPa, fibrinógeno, tiempo de trombina, factor VIII:C, FvW:Ag, FvW : RCo. Se obtuvo muestra de plasma pobre en plaquetas y fueron guardadas bajo congelación a -70 grados hasta que fueron utilizadas. Se realizó el ensayo de multímeros de FvW en geles de agarosa de 0.8 y 1.2%. Se diagnosticó EvW en 53 pacientes. 34 mujeres y 19 hombres. 47 pacientes (88.7%) tuvieron EvW tipo 1, 4 (7.5%) tuvieron tipo 2 A, Y 2 (3.8%) tuvieron EVW tipo 3. El grupo sanguíneo O fue encontrado en 44 pacientes con tipo 1, y 2 pacientes con tipo 2 A. Los síntomas clínicos más frecuentes fueron la epistaxis (84,9%), equimosis (79,2%), hematomas (71,7%), gingivorragias (62,3%) y petequias (50,9%). Sangrado postoperatorio se encontró en 17 pacientes (32,1%). Se concluyó la presencia de EvW en México y la importancia de una descripción más detallada de EvW. Los esfuerzos para aumentar la conciencia y el diagnóstico de EvW podrían ayudar a una mejor identificación de los pacientes con trastornos de la coagulación y detección temprana, así como el tratamiento adecuada de las terapias seguras y eficaces, como la desmopresina y los concentrados de plasma.<sup>30</sup>

## **II. JUSTIFICACION.**

La enfermedad von Willebrand (EvW) es el padecimiento hemorrágico más frecuente a nivel mundial y por lo tanto presente en la población mexicana a pesar del subdiagnóstico predominante.

En la actualidad, se desconoce la prevalencia en la población pediátrica y es muy factible que afecte a un porcentaje importante de la población con manifestación de hemorragias inexplicables.

En estudios previos realizados en Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente se integró un posible diagnóstico de acuerdo a las pruebas de escrutinio y confirmatorias iniciales por la relación entre los valores de función y nivel de antígeno del factor von Willebrand, a confirmarse con el ensayo de multímeros el cual, se inició en cuatro pacientes una vez lograda la estandarización del ensayo de multímeros y en este proyecto se pretende ampliarlo a más de 100 pacientes que han sido captados desde los estudios iniciales. Con este avance, se realizará la confirmación diagnóstica del tipo de enfermedad y la subtipificación de las variantes cualitativas de la enfermedad von Willebrand tipo 2.

Adicionalmente se considerará en la definición del diagnóstico el grupo sanguíneo del paciente ya que en los pacientes del grupo O el nivel del antígeno del factor de von Willebrand disminuye de un 20 a 25%, por lo cual, se investigará si la consideración de esta variación permite definir con mayor precisión el diagnóstico del tipo de EvW, confirmando posteriormente con el patrón de los multímeros de FvW.

### **III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En la actualidad la Enfermedad de von Willebrand (EvW) es subdiagnosticada en todos los niveles de atención médica, por lo que es necesario establecer el diagnóstico y subtipificación de los pacientes pediátricos en los que se sospecha la EvW, mediante la estandarización clínica y laboratorial de la enfermedad realizando el análisis de multímeros en cada paciente y ponderando el nivel de FvW:Ag de acuerdo al grupo sanguíneo que causa una variación en el mismo de un 20%.

De acuerdo a lo anterior planteamos la siguiente pregunta de investigación:

**¿ La definición del tipo de EvW mediante los valores de función y antígeno de FvW ponderando por grupo sanguíneo aumenta la precisión en el diagnóstico que puede confirmarse por análisis de multímeros del FvW?**

#### **IV. HIPOTESIS**

La ponderación del grupo sanguíneo considerando la variación de un 20% del nivel del FvW:Ag permite mayor precisión del diagnóstico del tipo del EvW.



## **V. OBJETIVOS.**

### **Objetivo general.**

Realizar un escrutinio clínico-laboratorial en pacientes con sospecha de EvW confirmando su diagnóstico por la relación entre la actividad y el nivel del antígeno de FvW ponderando por el grupo sanguíneo y su confirmación por análisis de multímeros en pacientes del Hospital de Pediatría del CMNO.

### **Objetivos específicos.**

1. Determinar la presentación clínica de la EvW mediante un historial clínico estandarizado y pruebas de laboratorio de escrutinio y confirmatorias.
2. Definir el diagnóstico del tipo de EvW mediante la relación entre la actividad y nivel de antígeno de FvW y su ponderación por el grupo sanguíneo.
3. Corroborar el diagnóstico del tipo de EvW y determinar la subtipificación por medio del análisis de multímeros del FvW.

## **VI. MATERIAL Y METODOS**

### **DISEÑO DE ESTUDIO**

#### **VI.1. Clasificación del estudio.**

Transversal, analítico.

#### **VI.2. Universo de trabajo.**

Población pediátrica referida a la unidad de tercer nivel con diagnóstico o sospecha de Enfermedad von Willebrand.

Edad de 1 año hasta 16 años de edad.

Valorados por consulta externa de hematología pediátrica o que ingresen al área de urgencias pediatría o al servicio de hospitalización de hematología pediátrica, incluyendo los pacientes que se tienen con diagnóstico de EvW en el Centro de Investigación Biomédica de Occidente. (CIBO).

#### **VI.3 .Variables**

DEPENDIENTE: Severidad del cuadro hemorrágico, presencia y severidad de EvW .

INDEPENDIENTE:

Nivel de hemoglobina, hematocrito, recuento de plaquetas, tiempo de protrombina (TP) , tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa), fibrinógeno, tiempo de sangrado de Ivy, antígeno del factor de von Willebrand (FvW: Ag), actividad del cofactor ristocetina (FvW: RCo), actividad del factor FVIII (FVIII: C), patrón de multímeros de FvW.

INTERVENIENTES: Edad, Sexo, Grupo sanguíneo ABO.

• OPERACIONALIZACION DE LAS VARIABLES

VARIABLE	DESCRIPCION	TIPO	UNIDAD DE MEDICION.		ESTADISTICA DESCRIPTIVA
<b>Edad</b>	Tiempo de vida cumplido al momento del estudio.	Cuantitativa continúa.	Años.		Promedio Desviación estándar. Rangos.
<b>Sexo</b>	Clasificación en hombre o mujer de acuerdo a características fenotípicas, otorgado al momento de nacer	Cualitativa, Nominal	Masculino/ femenino		Frecuencias Proporciones
<b>Grupo sanguíneo</b>	Tipos en los que se clasifica la sangre en función de los antígenos presentes en los glóbulos rojos.	Cualitativa Nominal	A, B, AB, O.		Frecuencias Proporciones.
<b>Hemoglobina</b>	Se mide en gramos por decilitro (g/dL) y representa la cantidad de esta proteína por unidad de volumen, debe ser el único para definir si existe o no anemia. Sus cifras normales o de referencia son variables y depende de la edad sexo y altura sobre el nivel del mar principalmente.	Cuantitativa Nominal.	Edad	Hb (g/dl)	Promedio Desviación estándar. Rangos.
			2 a 3 años	11.2 a 14.2 11.5 a	
			4 a 6 años	14.4 11.5 a	
			> 6- 12a	15.8	
			12 -18 años		
			fem	12 a 15	
			masc	13 a 16	
<b>Hematocrito.</b>	Se mide en porcentaje (%) y representa la proporción de	Cuantitativa nominal.	Edad	Hcto (%)	Promedio Desviación estándar
			2 a 3 años	33 a 37	

	eritrocitos en el total de la sangre, y los valores normales dependen al igual del sexo edad y altura sobre el nivel del mar		4 a 6 años > 6-12 años 12-18 años Fem masc	33 a 37 35 a 40 36 a 41 37 a 43	Rangos.
<b>Recuento plaquetario.</b>	Son producidas por los megacariocitos y no poseen núcleo, se adhieren al endotelio y se agregan para formar el tapón hemostático e interaccionan con factores de la coagulación	Cuantitativo nominal	150 a 300 x10 <sup>9</sup> /L		Promedio Desviación estándar Rangos.
<b>FvW (Factor de von Willebrand)</b>	Glicoproteína multimérica que promueve la adhesión y agregación plaquetaria y es un portador del FVII en plasma.	Cuantitativa continua.	Porcentaje de actividad.		Promedio Desviación estándar. Rangos
<b>FvW:RCo (FvW: actividad del Cofactor de ristocetina)</b>	Actividad de unión del FvW que causa unión del FvW a las plaquetas en presencia de ristocetina con la consecuente aglutinación. Actividad del cofactor de Ristocetina: cuantifica la aglutinación	Cuantitativa continua.	50-200 UI/DL		Promedio Desviación estándar. Rangos

	plaquetaria después de la adición de Ristocetina y FvW. Mide funcionalidad del FvW. Explora la interacción entre el FvW con el complejo glucoproteico Gp Ib/IX			
<b>FvW:Ag. (Antígeno del FvW)</b>	Proteína de FvW medida por pruebas de proteínas. Prueba de anticuerpos policlonales contra el FvW, los cuales se ligan a la superficie plástica de los pocillos de una placa de microtitulación	Cuantitativa Continua	50-200 UI/DL	Promedio Desviación estándar. Rangos.
<b>FvW Multímeros</b>	Distribución del tamaño de los multímeros medidos por electroforesis en gel de agarosa Prueba de multímeros del FvW. Electroforesis en gel de agarosa y visualización por anticuerpos monoespecíficos de FvW	Cualitativa/ Cuantitativa Nominal	Patrón multimérico	Promedio Desviación estándar. Rangos
<b>FVIII (Factor VIII)</b>	Proteína circulante de la coagulación, protegida por el	Cuantitativa Continúa.	50-150 %.	Promedio Desviación estándar. Rangos

	FvW y es importante en la generación de trombina. Cuantifica actividad.			
<b>Fibrinógeno</b>	Cantidad funcional de fibrinógeno, se mide de manera cinética por método coagulométrico técnica de Clauss	Cuantitativa Continúa.	Numérico 200-400 mg/dL.	Promedio Desviación estándar. Rangos
<b>Tiempo de sangrado de Ivy estandarizado</b>	Tiempo entre la realización de una pequeña incisión en la piel, de 1mm de profundidad y longitud de 3 mm, que produce sangrado y el momento en que este se detiene. Mide la interacción de plaquetas con la pared de los vasos sanguíneos y subsecuente formación del coagulo. Mide etapas tempranas de hemostasia (vascular y plaquetaria). Evalúa: vasoconstricción, tejido perivascular, endotelio, la adhesión y	Cuantitativa Continúa.	Unidad de tiempo en minutos. Niños: 1.3 a 8.99 min. Adultos: 2 a 8 minutos.	Promedio Desviación estándar. Rangos

	agregación plaquetaria, la liberación de nucleótidos, los fosfolípidos plaquetarios y la producción de prostaglandinas.			
<b>Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa)</b>	Es el tiempo en segundos que tarda en coagular un plasma citratado después de agregarle tromboplastina parcial con un activador (caolín, sílice microlizada, ácido elágico) y calcio a una temperatura 37 °C pH 7.4 Se valora la vía intrínseca de la coagulación factores XII, XI, IX, VIII y también los factores X, V, II, I, valorando la vía intrínseca y común.	Cuantitativa Continua.	Rango normal 30-32 segundos.	Promedio Desviación estándar. Rangos
<b>Tiempo de protrombina (PT)</b>	Refleja la eficacia global de la vía extrínseca y vía común Sensible a cambios en los factores V, VII, X y II.	Cuantitativa Continúa.	La sensibilidad de la prueba se ve influenciada por el reactivo y la técnica utilizada. Es importante establecer un rango de referencia local.	Promedio Desviación estándar. Rangos

			Valor:12 ± 3 segundos.	
<b>Cuadro hemorrágico leve</b>	Severidad de sangrado entre 0 y 10 puntos evaluado, según la escala de severidad de hemorragia empleada en encuesta clínica.	Cualitativa nominal	0 a 10 puntos	Frecuencia Proporciones
<b>Cuadro hemorrágico moderado</b>	Grado de severidad de sangrado entre 11 y 20 puntos, evaluando según escala de severidad de hemorragia empleada en encuesta clínica	Cualitativa nominal	11 a 20 puntos	Frecuencia Proporciones
<b>Cuadro hemorrágico severo</b>	Grado de severidad de sangrado entre 21 y 30 puntos, evaluado según escala de severidad de hemorragia empleada en encuesta clínica	Cualitativa Nominal.	21 a 30 puntos	Frecuencia Proporciones

Nichols WL. 2008.<sup>4</sup> Martínez-Murillo C. 2012.<sup>3</sup>



#### **VI.4. Cálculo del tamaño de muestra**

##### **Muestreo no aleatorio consecutivo.**

Se incluyeron a los pacientes de la base de datos del CIBO con diagnóstico clínico o sospecha de Enfermedad de von Willebrand (EvW) que fueron captados del año 2010 hasta noviembre 2013.

#### **VI.5 Criterios de selección de los grupos de estudio.**

##### *VI.5.1. Criterios de inclusión:*

Pacientes pediátricos con alteración de las pruebas de escrutinio y antecedente de sangrado mucocutáneo, con sospecha de EvW y cuyas manifestaciones clínicas no puedan ser explicadas por otras enfermedades; historial personal y/o familiar de trastornos hemorrágicos.

Pacientes cuyos padres o tutores aceptaron la realización de las pruebas de laboratorio con consentimiento informado firmado.

Pacientes con edad comprendida entre los 1 a 16 años de edad.

Género masculino o femenino.

##### *VI.5.2. Criterios de no inclusión:*

Pacientes cuyos padres o tutores que no firmaron el consentimiento informado para participar en el estudio.

Pacientes con manifestaciones hemorrágicas debidas a hemofilia.

Pacientes con alteraciones físicas o de laboratorio que pudieran interferir en la función o niveles del Factor de von Willebrand (FvW).

Pacientes con ingesta de medicamentos que interfieran con los niveles y función del FvW o que causen alteración de las plaquetas.

Pacientes con pruebas de laboratorio incompletas.

### *VI.5.3. Criterios de exclusión:*

Pacientes cuyos padres o tutores quisieron salir del estudio.

Muestras de pacientes que no fueron procesadas.

### **VI.6 Lugar de estudio:**

U.M.A.E. Hospital de Pediatría y Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO), del Centro Médico Nacional de Occidente Instituto Mexicano del Seguro Social.

## **VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Se realizó estadística descriptiva de la población estudiada con un recuento de frecuencias para variables cualitativas por grupos de diagnóstico; para variables cuantitativas se calcularán los rangos, promedios y desviaciones estándar por grupos de diagnóstico.

Se realizaron tablas de contingencia para las variables cualitativas y se contrastarán con la prueba de Ji-cuadrada para identificar las variables que mostraron diferencias estadísticamente significativas en la correlación clínica y de pruebas confirmatorias de laboratorio, con valor de  $p < 0.05$ .

La contrastación de las variables cuantitativas con la finalidad de establecer la correlación existente entre las variables clasificadas en grupos por edad, sexo, grupo sanguíneo, y diagnóstico probable se realizaron a través de análisis de varianza (ANOVA) y de la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene.

La base de datos se capturaron en Excel 2011 y los datos recabados fueron capturados en el paquete estadístico: Statistical Package for Social Sciences para Windows. (SPSS versión 20.0).

## VIII. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El protocolo de estudio fue sometido a comité local de investigación, la información generada fue confidencial y los resultados fueron con fines de investigación. Los procedimientos realizados están de acuerdo con las normas éticas, el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y con la declaración de Helsinki de 1975 enmendada en 1989 y códigos y normas Internacionales vigentes de las buenas prácticas de la investigación clínica. De acuerdo a la Ley General de Salud estudio tipo 1 de tipo descriptivo. Se solicitó consentimiento informado.

Conflicto de intereses no existen.

## IX. ORGANIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.

### 1. PROGRAMA DE TRABAJO

Evaluación del anteproyecto por el Comité de Investigación del CMNO.

### 2. CAPTACION DE LOS PACIENTES:

Fueron captados los pacientes de los servicios de hematología de la UMAE pediatría IMSS estudiados por sospecha clínica de enfermedad von Willebrand (TTP prolongado y sangrados mucocutáneos o asintomáticos con pruebas de coagulación sugerentes TTP prolongado)

### 3. APLICACIÓN DE UN CUESTIONARIO CLINICO

El paciente con sospecha de EvW, se le realizó a una entrevista con aplicación de un **cuestionario clínico estandarizado** (Anexo 1) en el que se abordó los siguientes aspectos de diagnóstico: historial personal, incluyendo manifestaciones hemorrágicas previas, tratamientos, estudios de laboratorio anteriores; historia familiar y la exploración física del paciente por parte del médico tratante. Con dicha información se proporcionó ***la evaluación de la tendencia hemorrágica***

que consideramos para la confirmación del diagnóstico de laboratorio. Al igual que en ese momento se nos firmó consentimiento informado (anexo 2)

#### **4. TOMA Y PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.**

La toma de muestra se llevó a cabo por el personal de laboratorio de la UMAE PEDIATRIA, enviada al Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO) para su procesamiento. Consistió en la recolección de 15 ml de sangre periférica (2 tubos de Na citratado y 1 tubo de EDTA sódico). Una vez recibidas las muestras en el laboratorio de Bioquímica III del CIBO, se realizó la separación del plasma sanguíneo citratado por el método de doble centrifugación para la obtención de plasma pobre en plaquetas (ppp) y a la extracción de ADN de sangre periférica con EDTA por el método de Miller, 1988. (ANEXO 3)

#### **5. REALIZACION DE PRUEBAS DE ESCRUTINIO O PRUEBAS INICIALES**

Se realizó en el laboratorio de la UMAE PEDIATRIA, los cuales incluyó: nivel de hemoglobina, recuento plaquetario, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial activada, fibrinógeno, tiempo de sangrado de Ivy y grupo sanguíneo.

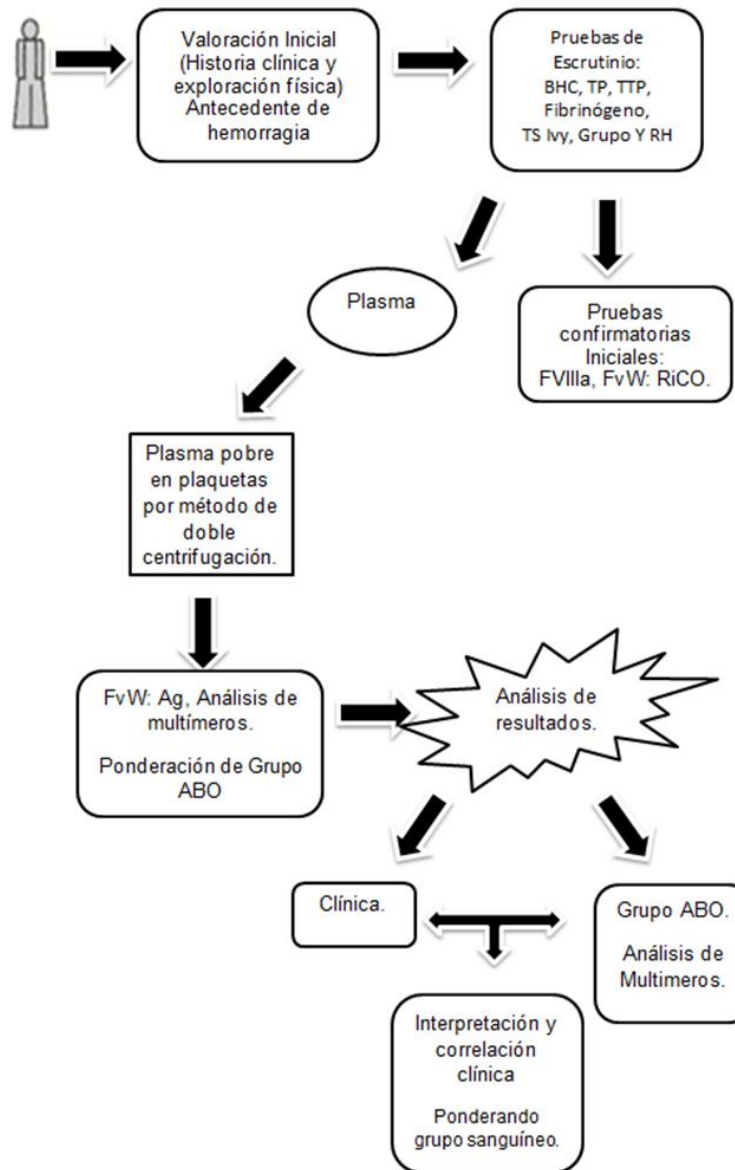
#### **6. PRUEBAS DE CONFIRMACION INICIAL.**

Las pruebas confirmatorias iniciales correspondieron a la cuantificación del Factor VIII, actividad del FvW (FvW:RCo), realizados en el laboratorio clínico de pediatría; en el CIBO se realizaron la cuantificación de factor von Willebrand antigénico (FvW: Ag) El diagnóstico del tipo de EvW se basó en la relación entre el FvW:RCo y el FvW:Ag y se consideró la variación de éste último (20%) de acuerdo al grupo sanguíneo del paciente. Este resultado se corroboró con el análisis de multímeros de FvW como prueba confirmatoria final

## **7. PRUEBAS DE CONFIRMACION FINAL.**

Constó de la realización del análisis de multímeros para corroborar el diagnóstico del tipo de EvW y determinar en base al patrón de agregación de multímeros, tomando en cuenta el grupo sanguíneo de los pacientes, lo cual nos permitió llegar a un diagnóstico definitivo al distinguir entre las variantes de la enfermedad, la evaluación clínica y las pruebas confirmatorias iniciales. El diagnóstico del tipo de EvW se basó en la relación entre el FvW:RCo y el FvW:Ag y se consideró la variación de éste último (20%) de acuerdo al grupo sanguíneo del paciente. Este resultado se corroboró con el análisis de multímeros de FvW como prueba confirmatoria final.

**X. DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL DIAGNÓSTICO CONFIRMATORIO DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND.**



## **XI. RECURSOS HUMANOS**

Médicos hematólogos pediatras, personal de laboratorio que labora en el IMSS.

### **• FISICOS Y MATERIALES**

Área Consulta Externa, área CIBO.

### **• FINANCIAMIENTO**

Se cuenta con financiamiento para la realización del ensayo de multímeros. (FHRM, Lab CSL Behring, México).

### **• INFRAESTRUCTURA.**

Contamos con el apoyo diagnóstico del laboratorio de hematología la U.M.A.E. del Hospital de Pediatría en donde se realizarón las pruebas de escrutinio y dos pruebas confirmatorias iniciales (FvW: RCo y FVIII:C). El resto de las pruebas confirmatorias iniciales y el análisis de multímeros se realizó en CIBO con el apoyo de la Federación Mundial de Hemofilia y CSL Behring para la compra de los insumos para la toma y procesamiento de muestras, y realización de los ensayos confirmatorios. El laboratorio de la División de Genética del CIBO, IMSS, cuenta con centrifugas refrigeradas, balanzas, equipos de electroforesis y accesorios para la toma de muestras de sangre y su procesamiento, así como congeladores a -80oC para la crio-conservación de las muestras de plasma que se captan hasta la realización de los ensayos funcionales de FvW y análisis de multímeros.

## **XII. RESULTADOS.**

Se estudiaron pacientes pediátricos que acudieron a la consulta externa de hematología pediátrica del Centro Médico Nacional de Occidente con antecedente de hemorragias y la sospecha de enfermedad de von Willebrand desde el año del 2010 hasta noviembre del 2013. Los pacientes procedían de los estados de Jalisco, Nayarit, Colima y Michoacán, que fueron enviados al CIBO para estudios confirmatorios. Se realizó un estudio global, de todos los pacientes para describir su comportamiento clínico y laboratorio, tomando en cuenta su grupo sanguíneo, ya que en estudios previos no se había considerado el mismo.

En el año 2013 se captaron 41 pacientes que acudieron a la consulta externa de hematología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente con sospecha de EvW y enviados al CIBO para estudios confirmatorios. Con el fin de evaluar el papel del grupo sanguíneo en el diagnóstico, se incluyeron en el análisis los pacientes estudiados desde el 2010 en los estudios previos, de quienes se contaba con los datos clínico-laboratoriales, integrando un total de 94 pacientes para el análisis global.

Del total de pacientes, 49 fueron mujeres (52.1%) y 45 hombres (47.8%). El promedio de edad fue de 9 años con un rango de 1 -16 años.

Presentaron grupo O 65 pacientes (61.1%) y 19 pacientes (17.8%) grupos A, B y AB (clasificados como grupo no O); sólo en 10 pacientes (9.4%) no se contó con el dato del grupo sanguíneo debido a que en los primeros pacientes captados no incluían su grupo sanguíneo.

Se realizó una evaluación clínica mediante la aplicación de un cuestionario estandarizado que valoró la gravedad de las manifestaciones hemorrágicas, posteriormente se realizaron las pruebas de laboratorio incluyendo el escrutinio y las pruebas confirmatorias iniciales, que integraron las variables analizadas en el estudio en cada caso



Los antecedentes familiares de sangrado mucocutáneo se presentaron en 62 pacientes (66%), y sólo 1(1%) presentó antecedente de hemofilia. Se reportaron 11 (12%) con antecedentes de familiares con diagnóstico de EvW.

La edad promedio de la presentación del primer evento de sangrado fue de 3 años y 6 (6.38%) pacientes no presentaron ningún sangrado sólo alteración en TTPa en exámenes pre quirúrgicos. La causa principal del primer evento en estos pacientes fue la epistaxis en 52 pacientes (55.3%), seguido de equimosis en 16 pacientes (17%).

La sospecha diagnóstica que tenían los pacientes previo al estudio, fue en la mayoría la enfermedad de von Willebrand en 51 pacientes (54.2%), trombocitopenia inmune primaria en 16 pacientes (17.02%), 7 pacientes (7.44%) con diagnóstico de coagulopatía en estudio y 20 pacientes con otros diagnósticos.

Sólo 43 pacientes (45.7%) comentaron que por lo menos en una ocasión tuvieron que acudir a atención médica.

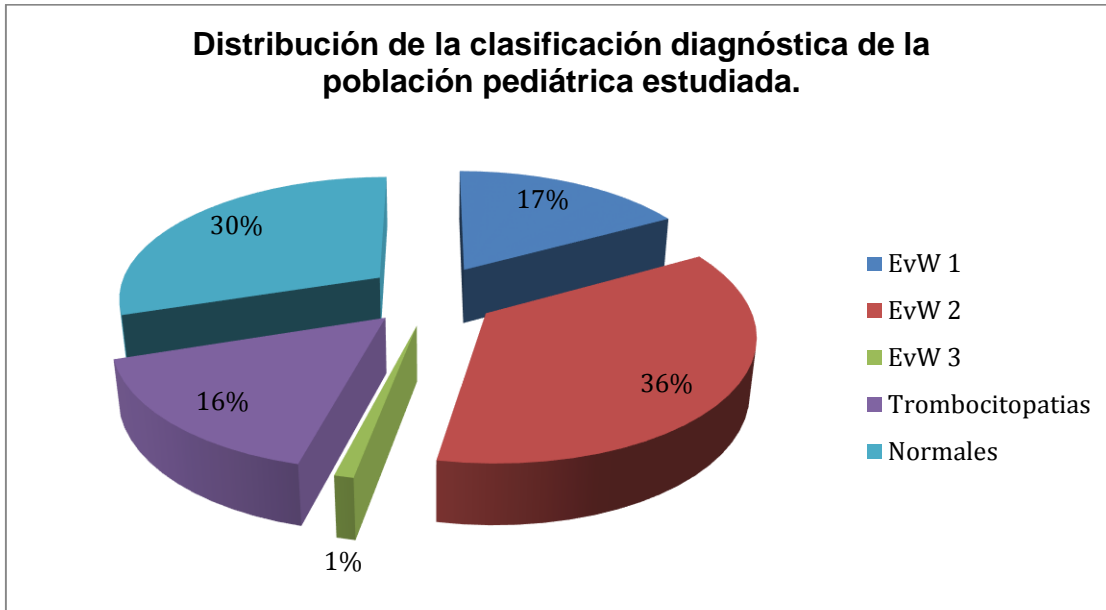
En nuestra población de estudio, la manifestación hemorrágica que se observó con más frecuencia fue la epistaxis en 58 pacientes (61%), seguida de equimosis en 48 pacientes (51%) y hematomas en 36 pacientes (38%)(Cuadro 7)

**Cuadro 7. Manifestaciones clínicas en los pacientes estudiados.**

<b>EVENTO</b>	<b>FRECUENCIA</b>
<b>Epistaxis</b>	58 (61%)
<b>Equimosis</b>	48 (51%)
<b>Hematomas</b>	36 (38%)
<b>Anemia</b>	24 (25.5%)
<b>Sangrado postcirugía dental</b>	21(22.34%)
<b>Hemorragia gastrointestinal</b>	19 (20%)
<b>Hemorragia uterina anormal</b>	16 (17%)
<b>Hemartrosis</b>	6 (6.3%)
<b>Sangrado postamidalectomia</b>	5 (5.3%)

Para fines del análisis de correlación clínico–laboratorial se definieron cinco diagnósticos probables de acuerdo a las manifestaciones clínicas y los estudios confirmatorios. Se determinó el diagnóstico del tipo de EvW de acuerdo a los valores de la relación  $FvW:Rco / FvW:Ag$ .<sup>3</sup> Cuando la relación fue mayor a 0.7, se considera una EvW tipo 1 por deficiencia cuantitativa. Si la relación es menor de 0.7 se sospecha de una EvW tipo 2 o deficiencia cualitativa o de función del FvW. Cuando ambos valores fueron cercanos a cero, se consideró una deficiencia por la ausencia completa del FvW, correspondiendo a una EvW tipo 3. Cuando los valores tanto de función como de nivel de antígeno fueron normales, se indicó que tuvieron FvW normal por criterio de laboratorio, sin embargo, con la presencia de sintomatología clínica (al menos dos de los parámetros analizados), se considera que los pacientes tienen EvW y se deben verificar las pruebas de laboratorio confirmatorias. Los pacientes asintomáticos o con antecedentes de hemorragias muy esporádicos y con pruebas de escrutinio y confirmatorios normales se consideraron como normales, descartando EvW. En el caso de pacientes con los valores confirmatorios normales de FvW, presencia de sintomatología hemorrágica y ya sea trombocitopenia (con valores de plaquetas menores a 150,000 cel/uL), o con valores de plaquetas normales pero un tiempo de sangrado de Ivy prolongado, se descartaron como EvW y se clasificaron como trombocitopatía, requiriendo de pruebas de función plaquetaria para la confirmación del diagnóstico.

En la población de estudio, el diagnóstico probable que con más frecuencia se presentó fue el clasificado como enfermedad de von Willebrand tipo 2, con 34 pacientes (36%) ( Figura 9).



**Figura 9.** Clasificación diagnóstica definida en la población de pacientes por la evaluación clínico-laboratorial.

Las manifestaciones clínicas fueron ampliamente variables en los pacientes estudiados sin encontrar diferencias significativas de acuerdo al probable diagnóstico (EvW tipo 1, 2 ó 3) definido por las pruebas de laboratorios confirmatorios.

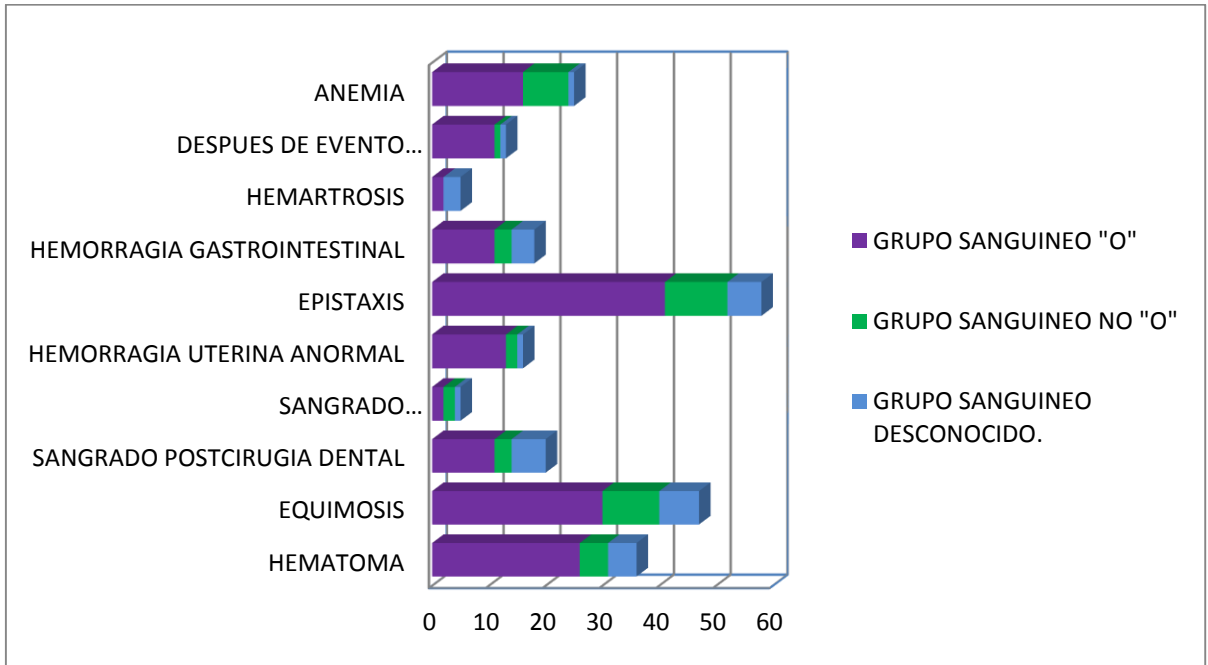
Se obtuvieron la media y la desviación estándar, los parámetros de pruebas de escrutinio y confirmatorias considerando el grupo sanguíneo. Se observó que disminuye el antígeno de FvW en los grupos O con una media de 64.66 y una desviación estándar de 24.88 en comparación con los grupos no O donde la media resultó de 80.78 y la de desviación estándar de 34.76 (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Valores de media y desviación estándar de las pruebas de escrutinio y confirmatorias de los pacientes por grupo sanguíneo.

VARIABLE	GRUPO SANGUINEO O		GRUPO SANGUINEO NO O		GRUPO SANGUINEO NO DETERMINADO.	
	MEDIA	SD	MEDIA	SD	MEDIA	SD
Hb (g/dL)	13.88	1.35	13.68	1.94	14.84	0.79
Hto( %)	41.090	4.51	41.52	6.21	43.5	2.62
Plaquetas (10 <sup>3</sup> x dL)	266.60	108.75	259.57	127.86	230.20	69.73
TP(segundos)	12.13	.8513	12.063	0.873	13.14	0.873
TTPa(segundos)	41.22	9.20	36.09	5.00	39.8	7.34
Fibrinógeno (mg/dl)	246.40	56.14	286.76	52.77	236.10	43.61
Tiempo sangrado Ivy (minutos)	7.22	4.608	8.84	5.38	6.30	5.03
Actividad FVIII%	85.46	33.57	102.91	37.89	85.06	29.66
Actividad Rco%	64.84	35.61	70.10	27.66	47.00	37.13
FvW:Ag	64.66	24.88	80.78	34.76	69.60	25.06
FvWRco/FvW:Ag	1.26	1.59	0.98	0.43	0.64	0.27

Hb: hemoglobina, Hto: hematocrito, TP: tiempo de protrombina en segundos, TTPa: tiempo de tromboplastina parcial activada activado en segundos, función de FvW (actividad de cofactor de ristocetina) y nivel de antígeno de FvW.

De acuerdo a las manifestaciones clínicas y grupo sanguíneo, predominaron los pacientes del grupo O con cuadros de hemorragias principalmente epistaxis en 41 pacientes (43.61%) seguido de equimosis en 30 pacientes (31.91%) y hematoma en 26 pacientes (27.65%) (Figura 10).



**Figura 10.** Manifestaciones clínicas y grupo sanguíneo en pacientes pediátricos.

Se realizó la prueba exacta de Fisher para correlacionar el grupo sanguíneo y el diagnóstico probable, observando que los pacientes con grupo sanguíneo O fueron los que presentaron enfermedad de von Willebrand con más frecuencia pero fue estadísticamente no significativo (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Clasificación diagnóstica y grupo sanguíneo en pacientes pediátricos.

DIAGNÓSTICO	GRUPO SANGUINEO O	GRUPO SANGUINEO NO O	SIN DATOS DE GRUPO SANGUINEO.	VALOR DE P*
EvW tipo 1	13 (72.2%)	3 (68.8%)	2 (11.1%)	>0.05
EvW tipo 2	22 (68.8%)	3 (9.4%)	7 (21.9%)	>0.05
EvW tipo 3	1 (100%)	0	0	>0.05
Trombocitopatía	9 (60%)	6 (40%)	0	>0.05
Normal	20 (71.4%)	7 (25%)	1 (3.6%)	>0.05

Valor de p por Prueba Exacta de Fisher.

De acuerdo a la gravedad de sangrado, determinado con la escala de severidad de sangrado con la puntuación asignada, se consideró de 0 puntos como asintomáticos, con cuadro hemorrágico leve a los pacientes que obtuvieron de 1-10 puntos, moderado 11-20 puntos y severo 21 a 33 puntos, se encontraron 82 pacientes (87.23%) con sangrado leve, 4 (4.2%) con sangrado moderado, 1 (1.05) paciente con sangrado severo que fue la paciente con diagnóstico probable de EvW tipo 3 y 7(7.44%) sin reportar ningún sangrado (Cuadro 10).

**Cuadro 10.** Severidad de sangrado en los pacientes estudiados por grupo sanguíneo.

SANGRADO	GRUPO SANGUINEO O	GRUPO SANGUINEO NO O	GRUPO SANGUINEO NO DETERMINADO
SIN SANGRADO	6 (6.4%)	0	1(1.0)
LEVE	57 (60.6%)	18 (19.1%)	7 (7.4%)
MODERADO	3 (3.2%)	0	1 (1%)
GRAVE	0	0	1 (1%)

Con el fin de evaluar la validez de los criterios clínicos y de laboratorio por pruebas confirmatorias iniciales para identificar un posible diagnóstico de EvW, se realizó una prueba de homogeneidad de varianzas para analizar el grado de dispersión de las medidas de tendencia central y un ANOVA intergrupo e intragrupo para todas las variables, en las que se encontró diferencia estadística significativa pruebas post hoc.

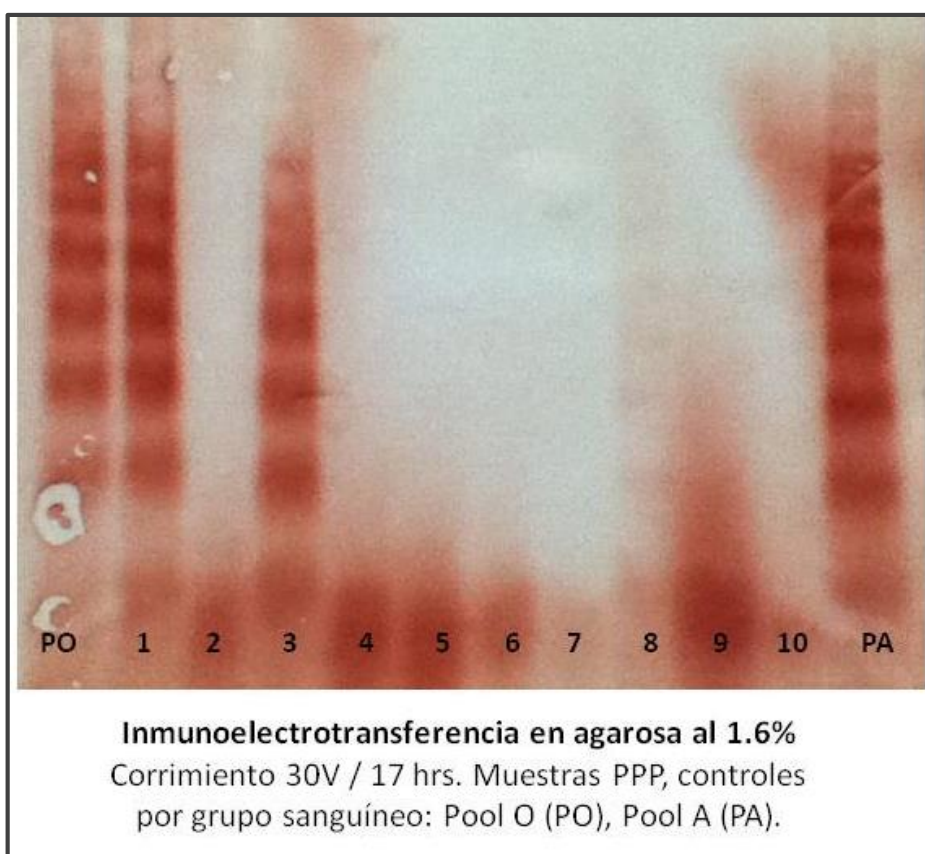
Para este análisis sólo se compararon los grupos EvW 1, EvW 2, trombocitopatías y pacientes normales. No se incluyó de este análisis el grupo EvW 3 por contar solamente con un paciente. Las variables en las que se encontró diferencia estadística significativa comprendieron las pruebas confirmatorias iniciales: plaquetas, tiempo de sangrado de Ivy, actividad de FVIII (FVIII: C), actividad de FvW (FvW: RCo) y la relación FvW:RCo / FvW:Ag (Cuadro 11).

**Cuadro 11.** Evaluación de los parámetros clínico-laboratoriales por prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA.

VARIABLE	HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS	ANOVA
<b>Escala de puntuación de tendencia hemorrágica</b>	0.003	0.448
<b>Plaquetas cel ml/<math>\mu</math>l</b>	0.551	0.000
<b>Tiempo de sangrado de Ivy (min)</b>	0.626	0.000
<b>Actividad del factor VIII(%)</b>	0.043	0.001
<b>Actividad de cofactor ristocetina (%)</b>	0.016	0.000
<b>Antígeno del factor de von Willebrand</b>	0.104	0.000
<b>FvWRCo/FvW:Ag</b>	0.000	0.000

En el análisis de multímeros de FvW se realizó por un ensayo de inmunoelectrotransferencia en agarosa a partir de los plasmas de los pacientes pobres en plaquetas. Con estas condiciones se logró una resolución media-alta con la que fue posible discriminar entre 9 y 12 multímeros (Figura 11). Se muestra la aplicación del ensayo para la verificación de 10 casos representativos con un diagnóstico probable a partir de las pruebas confirmatorias iniciales (Cuadro 12).

**Figura 11.** Análisis de multímeros de FvW en 10 casos representativos.





**Cuadro 12.** Casos representativos de los pacientes con pruebas confirmatorias iniciales.

Caso	Sexo	Puntaje tendencia hemorrágica	Gpo Sanguíneo	Plaquetas (cel x mil/uL)	FVIII:C	FvW:Rco	FvW:Ag	FvW:Rco/FvW:Ag	DX	Patrón de Multímeros
1	F	5	O+	238	57,0	55,0	61,0	0,9	1	N
2	F	13	O+	282	92,0	32,0	47,6	0,7	2	2A
3	F	5	O+	269	91,8	120,0	45,0	2,7	1	1
4	F	5	O+	428	104,2	120,0	84,5	1,4	N	2A
5	M	4	AB+	248	94,0	56,0	62,0	0,9	1	2A
6	F	4	O+	260	82,0	40,0	41,6	1,0	1	2A
7	M	6	O+	268	39,7	7,0	10,9	0,6	2	2A
8	F	6	O+	311	31,7	20,0	10,0	2,0	1G	1G
9	F	14	B+	225	113,8	58,4	105,5	0,6	2	2B
10	F	6	O+	556	0,8	20,0	23,3	0,9	1G	1G

Para la verificación del diagnóstico por las pruebas confirmatorias iniciales, en 27 pacientes se obtuvieron los datos del análisis de multímeros de FvW encontrando una concordancia del 96% (26 de 27 casos)( Cuadro 13).

**Cuadro 13.** Concordancia del diagnóstico de EvW por la relación FvW:Rco / FvW:Ag y el análisis de multímeros de FvW (n= 27 casos confirmados).

DX FvW:Rco / FvW:Ag (# CASOS)	DIAGNÓSTICO MULTÍMEROS (# CASOS)	CONCORDANCIA (%)
EvW tipo 1 (6)	EvW 1 (5), EvW 2A (1)	5/6 = 83%
EvW tipo 2 (18)	EvW 2A (6), EvW 2B (1), EvW 2M (11)	18/18 = 100%
EvW tipo 3 (1)	EvW tipo 3 (1)	1/1 = 100%
Trombocitopatía (1)	Patrón normal (1)	1/1 = 100%

La concordancia global fue del 96%, con una inconsistencia de 27 casos confirmados.

### **XIII. DISCUSION.**

La importancia de este trabajo además de reportar la enfermedad von Willebrand como una de las causas principales de enfermedades hemorrágicas en pacientes pediátricos tomando en cuenta la ponderación del grupo sanguíneo, también es considerar otros posibles diagnósticos como causas de alteraciones hemorrágicas.

A pesar que la enfermedad se presenta con variaciones clínicas amplias, se pudo observar que la gran mayoría de los niños fueron enviados al servicio de Hematología Pediátrica del Centro Médico de Occidente por las manifestaciones clínicas de sangrado cutáneo, y solo un pequeño porcentaje de estos fueron enviados exclusivamente por presentar TTPa prolongado, como hallazgos en los estudios preoperatorios solicitados para una cirugía determinada.

La manifestación clínica más frecuente de los pacientes estudiados con enfermedad de von Willebrand fue en un 61% la epistaxis seguida de la equimosis igual que lo reportado en otras publicaciones y mencionando que la equimosis se presenta con mayor predominio en los pacientes pediátricos.<sup>3</sup>

Reportamos una mayor tendencia de sangrado en los pacientes con grupo sanguíneo O que en los pacientes con grupo sanguíneo no O, pero esto no tuvo significancia estadística. En la literatura se menciona que existe una disminución de un 20-25% de los niveles de FvW en los pacientes del grupo O, por lo que se explicaría la mayor tendencia de sangrado en estos pacientes <sup>21</sup>.

En contraste, algunos pacientes con grupo sanguíneo no O, mostraron un nivel antigénico dentro de rangos normales y sintomatología hemorrágica, algunos de los cuales fueron diagnosticados como “normales”, por criterios de laboratorio. En este caso, aplicando la ponderación por grupo sanguíneo, podría tratarse de una EvW tipo 1 leve, por lo cual se amerita un seguimiento y la verificación de las

pruebas confirmatorias en una segunda toma, sobre todo considerando el efecto hormonal en las pacientes femeninas adolescentes.<sup>30</sup>

Con base en la clasificación clínica y laboratorial en relación del FvW RCo/ FvW:Ag, nosotros identificamos la enfermedad de von Willebrand tipo 2 como la variante más común en un 36%, lo cual es de esperarse tratándose de una población hospitalaria, la cual acude por una sintomatología hemorrágica considerable. De acuerdo a esta observación, el criterio que aplicamos de la clasificación de la gravedad de las manifestaciones clínicas no parece ser el adecuado al dividir el puntaje total en terciles, por lo cual se revisará el ajuste de la escala de acuerdo a una revisión cuidadosa de la tendencia hemorrágica y requerimiento de tratamiento en la población estudiada hasta encontrar una que refleje su comportamiento clínico. En la literatura se reporta que el tipo I como la variante predominante hasta en 80% de los pacientes en población general.<sup>3,5</sup>

Se detectó a un paciente con EvW tipo 3, la cual presentó un cuadro hemorrágico grave desde el año de edad, con epistaxis, hemartrosis, hematomas, y con cuadros de anemia grave que amerito transfusión de concentrado eritrocitario, así es característico de esta variante cuadro hemorrágico grave como lo descrito en la literatura.<sup>3</sup>

La confirmación diagnóstica de EvW por análisis de multímeros es importante principalmente para la subtipificación de las variantes tipo 2, que son las más frecuentes en población hospitalaria como lo confirma el presente estudio y los trabajos antecedentes en nuestro hospital.<sup>28,29</sup> El análisis de multímeros permite principalmente, la discriminación de la variante 2A vs. 2M, encontrando un patrón con ausencia de multímeros de peso molecular medio y alto (EvW tipo 2A), en contraste con un patrón normal observado en las variantes 2M y 2N. La variante 2N se sospecha con niveles francamente disminuidos del FVIII:C (entre 5-10%) y debe confirmarse con la prueba de unión entre FvW y FVIII.<sup>10</sup>

La variante 2B puede presentarse con trombocitopenia leve, sin embargo no es la regla, se verifica con la prueba de multímeros por la ausencia de agregados de alto peso molecular, sin embargo, en las condiciones técnicas logradas al momento, no es evidente la diferencia entre las variantes 2A y 2B, por lo cual, también debe acudir a otra prueba confirmatoria, como la agregación con ristocetina a dosis muy bajas (< 6 mg/dL), esperando una mayor afinidad en el caso de la variante 2B.<sup>3,4</sup>

Con el presente estudio, se evidenció que es importante el cuidado de las condiciones de almacenamiento en congelación a -80oC y el procedimiento de descongelación de las muestras, ya que se observaron algunas discordancias en ensayos repetidos con patrones distintos de un mismo paciente (2A vs. 2M ó 1), que podrían deberse a la degradación de la muestra por una descongelación inapropiada o bien, por el empleo de la muestra con más de una descongelación, por lo cual, no se obtuvieron un mayor número de casos confirmados porque será necesario verificar el ensayo de multímeros con el cuidado de éstas condiciones.

En este estudio, reportamos a 15 pacientes con diagnóstico probable de trombocitopatías, todos con antecedente de cuadros hemorrágicos leve a moderados, tiempo de sangrado de Ivy prolongado y cifras plaquetarias normales o disminuidas.

Dentro del algoritmo para el estudio de los trastornos hemorrágicos se hace mención importante a las trombocitopatías hereditarias, por lo que se necesita la realización de frotis sanguíneo, agregometría e inmunofenotipo plaquetario cuando se tenga la sospecha clínica de trastornos plaquetarios hereditarios.<sup>31</sup>

Se debe de realizar una discriminación sobre la variante 2B debido a que los pacientes con este trastorno tienen una alteración en la función del FvW y no la función plaquetaria. El FvW tiene una mayor afinidad por el glucoreceptor Ib/IX/V, ocasionando unión del FvW plasmático a plaquetas acelerando la

reducción del factor a multímeros más pequeños y con menor efectividad en la formación de trombos, por este motivo en algunos pacientes se asocia con la presencia de trombocitopenia leve crónica.<sup>3</sup>

#### **XIV. CONCLUSIONES.**

La correlación clínico-laboratorial con pruebas de escrutinio iniciales son de gran utilidad para los pacientes con trastornos hemorrágicos y sospecha de enfermedad de von Willebrand.

Es importante considerar la relación entre las manifestaciones clínicas, el FvW: Rco, Factor VIII:C y FvW Ag para identificar variantes cuantitativas y en caso de sospecha de variantes cualitativas la confirmación con estudio de multímeros.

Se descarta hipótesis de diferencia de acuerdo a grupo sanguíneo a pesar que son evidentes las tendencias de menores niveles (Fvw:Ag y FvW:Rco) en pacientes con grupo O, importantes de considerar en pacientes con niveles antigénicos en el límite de normalidad y sintomatología hemorrágica.

La variante tipo 2 de la enfermedad de von Willebrand se presentó más frecuente en pacientes pediátricos del Centro Médico de Occidente, subtipo de la EvW frecuente en población hospitalaria.

En pacientes con trastorno hemorrágicos en los que se descartó EvW y se sospechó de una trombocitopatía, es necesario continuar con un abordaje diagnóstico que incluya el frotis sanguíneo, la agregometría plaquetaria e inmunofenotipo plaquetario.

El análisis de multímeros mostró una concordancia considerable con el diagnóstico definido por las pruebas confirmatorias iniciales (96%), sin embargo, su validez se restringe a la confirmación de las variantes 2A y 2M. Para la confirmación de los subtipos de EvW 2B y 2N, debe recurrirse a otras pruebas de verificación específicas.

## **XV. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.**

1. Robertson J, Lillicrap D, James PD. von Willebrand Disease. *Pediatr Clin N Am* 2008; 55: 377-392.
2. Orkin SH, Nathan DG, Ginsburg D, Look AT, Fisher DE, Lux SE. *Hematology of infancy and childhood*. 7 th edition. Canada: Saunders Elsevier 2009.
3. Martínez-Murillo C. Enfermedad de von Willebrand Guía Rápida. México. ZARPRA Ediciones y Health Business Group 2011.
4. Nichols, Hultin MB, James AH, Manco-Johnson MJ, Montgomery RR, Ortel TL, Rick ME et al. Guidelines von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia* 2008; 14:171–232.
5. Koedman JA, Meijers JC, Sixma JJ. Inactivation of human factor VIII by activated protein C. Cofactor activity of protein S and protective effect of von Willebrand factor. *J Clin Invest* 1988; 82:1236-1243.
6. Federici AB, Bonomi AB. Clinical diagnosis of von Willebrand disease. *Haemophilia* 2004; 10: 169-176.
7. Castaman G, Tosetto A, Rodeghiero F. Reduced von Willebrand factor survival in von Willebrand disease: pathophysiologic and clinical relevance. *J Thromb Haemost* 2009; 7 (Suppl. 1): 71–4.
8. Melo-Nava BM, Benítez H, Palacios JJ, Nieva B, Arenas D, Jaloma-Cruz AR, Navarrete C, Salamanca F, Peñaloza R. Molecular study of VWF gene from Mexican Mestizo patients with von Willebrand disease, and the finding of three new mutations. *Blood Cells Mol Dis*. 2007;39 (3):361-5.
9. Hillman RS, Ault KA, Rinder HM. *Hematología en la práctica clínica*. Cuarta edición. México: Mc Graw Hill 2006.
10. Morales-De la Vega A, Reyes-Maldonado E, Martínez-Murillo C, Quintana-González S. Enfermedad de von Willebrand tipo 2N “Normandy”. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2008; 46 (1): 55-62.

11. McKenzie SB. Hematología clínica. Segunda edición. México: El Manual Moderno 2000.
12. Sadler JE. von Willebrand factor assembly and secretion. *J Thromb Haemost* 2009; 7 (Suppl. 1): 24–7. 9.
13. Wise RJ, Dorner AJ, Krane M, Pittman DD, Kaufman RJ. The role of von Willebrand factor multimers and propeptide cleavage in binding and stabilization of factor VIII. *J Biol Chem* 1991; 266: 21948–21955.
14. Bendetowicz AV. Binding of factor VIII to von Willebrand factor is enabled by cleavage of the von Willebrand factor propeptide and enhanced by formation of disulfide-linked multimers. *Blood* 1998; 92: 529–38.
15. Saenko EL, Loster K., Josic D., Sarafanov AG. Effect of von Willebrand Factor and its proteolytic fragments on kinetics of interaction between the light and heavy chains of human factor VIII. *Thromb Res* 1999; 96: 343–54.
16. Koedam JA., Hamer RJ., Beeser-Visser NH, Bouma BN., Sixma JJ.. The effect of von Willebrand factor on activation of factor VIII by factor Xa. *Eur J Biochem* 1990; 189: 229–34.
17. Saenko EL, Scandella, DA. Mechanism for inhibition of factor VIII binding to phospholipid by von Willebrand factor. *J Biol Chem* 1995; 270: 13826–33.
18. Lenting PJ., Van de Loo, JW., Donath, MJ., van Mourik, JA., Mertens K. The sequence Glu1811-Lys1818 of human blood coagulation factor VIII comprises a binding site for activated factor IX. *J Biol Chem* 1996; 271:1935–40.
19. Nogami, K., Shima M., Nishiya K.. A novel mechanism of factor VIII protection by von Willebrand factor from activated protein C-catalyzed inactivation. *Blood* 2002 ; 99:3993–3998
20. O'Donnell, JS. and Laffan, MA. The relationship between ABO histo-blood group, factor VIII and von Willebrand factor. *Transfus Med* 2001; 11:343-351.
21. Favaloro EJ, Lillicarp D, Lazzari MA, Cattaneo M, Mazurier C, Woods A, et al. von Willebrand disease: laboratory aspects of diagnosis and treatment. *Haemophilia* 2004; 10(4):164-168.



22. Matsui T., Titani K. and Mizuochi T. Structures of the asparagine linked oligosaccharide chains of human von Willebrand factor. Occurrence of blood group A, B, and H(O) structures. *J Biol Chem* 1999; 267:8723-31.
23. Federici, AB., Elder, JH., De Marco L., Ruggeri, ZM., Zimmerman, TS. Carbohydrate moiety of von Willebrand factor is not necessary for maintaining multimeric structure and ristocetin cofactor activity but protects from proteolytic degradation. *J Clin Invest.* 1984; 74: 2049-2055.
24. Jenkins PV. and O'Donnell, JS ABO blood group determines plasma von Willebrand factor levels: a biologic function after all. *Transfusión.* 2006; 46:1836-1844.
25. O'Donnell JS, McKinnon TA., Crawley JT., Lane D.A. and Laffan MA. Bombay phenotype is associated with reduced plasma-VWF levels and an increased susceptibility to ADAMTS13 proteolysis. *Blood.* 2005; 106: 1988-1991.
26. Kitchen S, McCraw A, Echenagucia M. *Diagnosis of Hemophilia and Other Bleeding Disorders a laboratory manual. Second edition.* Canada: World Federation of Hemophilia. 2010.
27. Espitia-De La Hoz FJ. Manejo de la enfermedad de von Willebrand en Ginecología y Obstetricia. *Revista colombiana de obstetricia y Ginecología.* 2010; 61(2): 151-159.
28. MuñozRobles Diana C. Diagnóstico molecular de la enfermedad de von Willebrand en pacientes del Hospital de Pediatría del C.M.N.O. IMSS. Tesis para obtener el título de pediatría médica. Servicio de Hematología, UMAE Pediatría, Centro Médico Nacional de Occidente. 2012.
29. Paque-Bautista Carlos. Diagnóstico molecular por análisis de multímeros de la enfermedad von Willebrand en pacientes del Hospital de Pediatría del CMNO. Tesis para obtener el título de Hematólogo pediatra. Centro Médico nacional de occidente. 2013.
30. Majluf Cruz A, Vélez Ruelas MA, González Ávila AI, GarcíaChávez J, et al von Willebrand's disease in Mexico: a pilot study. *Haemophilia* 2012:1-5.

31. Nurden P, Nurden AT. Congenital disorders associated with platelet dysfunctions. *Thromb Haemost* 2008; 99: 253-263.

## XVI. ANEXOS

### 1) ANEXO 1. CUESTIONARIO DE VALORACION CLINICA.

**Cuestionario Clínico - Dx Enf. Von Willebrand**

Datos Personales				
FECHA: _____	Apellido paterno _____	Apellido materno _____	Nombre (s) _____	
Nombre: _____				
NSS: _____		Sexo: _____		
Fecha Nacimiento (d/m/a): _____				
Edad (años cumplidos): _____		Teléfono: _____		
Domicilio _____				
Calle y número _____		Colonia, Municipio, CP _____	Estado _____	
Historial Familiar (Genealogía al reverso)				
Hemorragias	O sí	O no		
Hemofilia A	O sí	O no		
Hemofilia B	O sí	O no		
E. von Willebrand	O sí	O no		
Historial Personal				
Edad inicio episodios sangrado: _____		Evento: _____		
Diagnósticos previos: <input type="radio"/> hemofilia A <input type="radio"/> hemofilia B <input type="radio"/> enf von Willebrand <input type="radio"/> otros				
Requerimiento de atención médica por sangrados: <input type="radio"/> sí <input type="radio"/> no				
Positividad a VIH: <input type="radio"/> sí <input type="radio"/> no				
Positividad a Hepatitis: <input type="radio"/> sí <input type="radio"/> no    tipo: _____				
Severidad del cuadro hemorrágico				
PUNTAJE: _____	0	1	2	3
Hematomas	ausente	<10 episodios/año sin tx	>10 episodios/año y/o terapia local	DDAVP o FVIII- FFW
Equimosis petequias	ausente	<10 episodios/año sin tx	>10 episodios/año y/o terapia local	DDAVP o FVIII- FFW
Después de cirugía dental	ausente	algunas sin tx, o tx local	siempre y terapia local	DDAVP o FVIII- FFW
Amigdalectomía	ausente	sin terapia local	terapia local	DDAVP o FVIII- FFW
Hemorragia uterina	ausente	Presente	Consulta, estrógenos, tx con hemo sutura	Transf., histerect., dilat./cuiretaje
Hemorragia postparto	ausente	Presente, hemo		Histerectomía
Epistaxis	ausente	<10 episodios/año sin tx	>10 episodios/año y/o terapia local	DDAVP o FVIII- FFW
Hemorragia gastrointestinal	ausente	1 episodio, sin terapia	>1 episodio sin tx o tx local	DDAVP o FVIII- FFW
Hemartrosis	ausente	sin terapia local	terapia local	DDAVP o FVIII- FFW
Después de cirugía	ausente	local	sangrado mayor con terapia local	DDAVP o FVIII- FFW
Anemia	ausente	sin tratamiento	tratamiento con hemo	Hemoderivados
Tratamiento previo		Respuesta a tratamiento		
Vasopresina	<input type="radio"/> sí	<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> adecuada	<input type="radio"/> parcial
Factor VIII	<input type="radio"/> sí	<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> adecuada	<input type="radio"/> parcial
Factor von Willebrand	<input type="radio"/> sí	<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> adecuada	<input type="radio"/> parcial
FVIII/FW	<input type="radio"/> sí	<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> adecuada	<input type="radio"/> parcial

Otro tr: \_\_\_\_\_ O sí \_\_\_\_\_ O no \_\_\_\_\_ O adecuada \_\_\_\_\_ O parcial \_\_\_\_\_  
 Cuál: \_\_\_\_\_

**Exploración física**

Talla _____ m	Peso _____ kg	Grupo Sanguíneo _____		
Petequias	O sí _____	O no _____		
Hematomas	O sí _____	O no _____		
Equimosis	O sí _____	O no _____		
Sangrado de mucosas	O sí _____	O no _____		
Hemartrosis	O sí _____	O no _____		
Otras alteraciones:	O hepatomegalia _____	O talla baja _____	O telegectasias _____	O esplenomegalia _____

**Pruebas de Laboratorio**


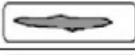

<b>Pruebas de screening</b>		
<b>Biometría hemática</b>		
Hemoglobina	_____	g/dL
Hto	_____	%
Plaquetas	_____	miles/ $\mu$ l
Leucocitos	_____	miles/ $\mu$ l
<b>Coagulación</b>		
TP	_____	segundos
TTPa	_____	segundos
Fibrinógeno	_____	mg/dL
Tiempo de sangrado de Ivy	_____	minutos
<b>Pruebas confirmatorias</b>		
Actividad del factor VIII (FVIII:C)	_____	%
Antígeno factor von Willebrand (FvW)	_____	UI/dL
Act. cofactor de ristocetina (FvW:Cx)	_____	%
Act. unión al colágeno (FvW:CB)	_____	UI/dL
Agregación de Ristocetina (RIPA)	_____	%
<b>Confirmatoria molecular</b>		
Análisis de multímeros	<input type="radio"/> Tipo 1 <input type="radio"/> Tipo 2A <input type="radio"/> Tipo 2B <input type="radio"/> Tipo 2M <input type="radio"/> Tipo 2N <input type="radio"/> Tipo 3	




**OBSERVACIONES**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Nombre de paciente		Fecha de nacimiento							
Toalla	1	2	3	4	5	6	7	8	
									
									
									
Coágulo/hemorragia									

Tampon	1	2	3	4	5	6	7	8
								
								
								
Coágulo/hemorragia								

Coágulo menor de 2cm 1, mayor de 2cm 5 puntos  
 Episodio de hemorragia 5 puntos

Puntaje: \_\_\_\_\_

## 2) ANEXO 2. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACION EN EL PROYECTO DE INVESTIGACION.

Guadalajara, Jal., \_\_\_\_\_ de 201\_\_.

#### A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto hago constar voluntaria y libremente que acepto la participación de mi hijo (a) \_\_\_\_\_ en el proyecto de investigación titulado **“Escrutinio clínico-laboratorial de enfermedad von Willebrand y su confirmación diagnóstica ponderada por grupo sanguíneo y análisis de multímeros de FvW en población pediátrica del CMNO”** cuyo objetivo es el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand integrando datos clínicos y pruebas de laboratorio iniciales que serán confirmadas por el análisis molecular de multímeros del factor von Willebrand. Estos estudios se ofrecen a mi hijo quien es paciente pediátrico con sospecha clínica y de laboratorio de la enfermedad. Este estudio se realiza con fines de investigación no lucrativos.

Se me ha informado que la participación de mi hijo consistirá en donar una muestra de 10 a 20 ml de sangre periférica mediante venopunción de fosa antecubital del antebrazo para obtención de plasma con la que se realizarán estudios de laboratorio y análisis molecular, así como la prueba de Tiempo de sangrado de Ivy que consiste en realizar una pequeña incisión de la piel del antebrazo. Las tomas de muestras se realizarán en dos fechas distintas, una en el laboratorio de la UMAE del Hospital de Pediatría y otra en el CIBO, IMSS y se me darán indicaciones sobre las condiciones en que debo llevar a mi hijo a las tomas para que no se alteren los resultados del estudio.

Adicionalmente SI (  ), NO (  ) doy mi consentimiento para que como parte de las tomas, se obtenga una muestra de DNA de mi hijo, que sea integrada a un banco de DNA de población mexicana con enfermedad de von Willebrand, que aportarán datos básicos sobre el padecimiento, los cuales, eventualmente podrán aplicarse al diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de von Willebrand.

Dichos estudios se realizarán previa aprobación por un comité de investigación y de ética que velará porque los procedimientos cumplan con los lineamientos de calidad científica y se apeguen a la normatividad que marca el Reglamento General de Salud en materia de Investigación para la Salud.

Deseo SI ( ), NO ( ) ser informado para dar mi consentimiento para participar en los futuros proyectos mencionados.

El investigador principal se ha comprometido a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, asimismo, estoy enterado sobre los posibles riesgos e inconvenientes derivados de mi participación en el estudio, que implican las molestias y posible hematoma por la punción venosa e incisión de la piel del antebrazo, y el riesgo de no ser diagnosticado por la falta de informatividad del análisis molecular.

El investigador principal me ha garantizado la confidencialidad de mis datos personales y se ha comprometido a mantener mi anonimato de manera que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones científicas que se generen de este estudio. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque ésta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

Como derechohabiente del IMSS, mi atención médica no será afectada por mi decisión de participar en el estudio.

Recibiré una copia de este documento para conservar constancia de los compromisos del investigador para conmigo y contar con sus datos donde pueda contactarlo en caso de cualquier aclaración sobre el estudio.

Nombre y firma del padre o tutor

Investigador

Testigo

Testigo

.....  
.....

**DATOS DEL INVESTIGADOR RESPONSABLE**

Ana Rebeca Jaloma Cruz

Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS

División de Genética

Sierra Mojada 800 Col. Independencia, C.P. 44340 Guadalajara, Jalisco.

Tel. (01-33) 3668-3000 extensión 31929; Fax. (01-33) 3618-1756

Correo electrónico: arjaloma@gmail.

### **3) ANEXO 3. TÉCNICAS.**

#### **3.1. MÉTODO DE DOBLE CENTRIFUGACIÓN PARA OBTENCIÓN DE PLASMA POBRE EN PLAQUETAS (PPP)**

- 1.- Centrifugar la muestra directamente del tubo para el tiempo de sangrado a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C.
- 2.- Separar el plasma (sobrenadante) con una pipeta de 1000 µL ajustada a 500 µL, con la punta siempre pegada a las paredes del tubo y adicionarlo en un tubo cónico de 15 ml (Nota: dejar aproximadamente 500 µL del sobrenadante en el tubo para tiempo de sangrado para evitar la recombinación de fases).
- 3.- Centrifugar la muestra en el tubo cónico de 15 ml a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C.
- 4.- Repartir el sobrenadante en alícuotas de 500 µL en tubos pequeños etiquetados con las siglas del nombre completo del paciente, añadiendo ppp (plasma pobre en plaquetas) y la fecha correspondiente al proceso.
- 5.- Guardar las muestras de plasma a -80°C.



### 3.2. CUANTIFICACIÓN DE FACTOR VON WILLEBRAND ANTIGÉNICO (FvW: Ag).

1.- Tras sacar las tiras con el anticuerpo anti-von Willebrand humano de su embalaje, se distribuyen considerando un duplicado por cada muestra.

- las diluciones estándar así como los controles y plasmas diluidos a ensayar.
- el reactivo 4 (blanco de reactivo)

2.- Efectuar el siguiente procedimiento, cuidando que todos estos pipeteos sobre la placa deben efectuarse en menos de 10 minutos.

Dispensar en cada pocillo:			
FIJACIÓN ANTÍGENO	DEL	MUESTRA	200µl
	Tapar los pocillos y mantener 1 hora a temperatura ambiente (18-25°C)		
Lavar 5 veces con solución de lavado y añadir inmediatamente:			
FIJACIÓN INMUNOCONJUGADO	DEL	Reactivo 2 (Enzima)	200µl
	Tapar los pocillos y mantener 1 hora a temperatura ambiente (18-25°C)		
Lavar 5 veces con solución de lavado y añadir inmediatamente poniendo en marcha un cronómetro:			
COLORACIÓN	TMB (Reactivo 3)		200µl
	Esperar exactamente 5 minutos a 18-25°C para cada muestra y a continuación añadir:		
	H2SO4 1M		50 µl
Dispensar el ácido en todos los pocillos, agitar la placa.			
15 minutos a 1 hora tras detener la reacción, medir la absorbancia a 450nm (ajustar a 0 con blanco de reactivo)			

PRINCIPIO DEL TEST: Un soporte plástico recubierto de anticuerpo de conejo anti-FvW humano (Reactivo 1) fija el FvW del plasma a valorar. El FvW fijado se revela con anticuerpos anti-conejo anti-FvW humano marcados con peroxidasa (Reactivo 2) que se fijan sobre los determinantes antigénicos libres. La cantidad de peroxidasa unida se mide por su actividad sobre el sustrato TMB (Reactivo 3).

Tras detener la reacción con un ácido fuerte, la intensidad de la coloración está en función de la concentración inicial de FvW presente en el medio.

### **3.3. ESTUDIO DE COMPOSICION MULTIMERICA DEL FACTOR DE VON WILLEBRAND.**

#### **• PROCEDIMIENTO ANALÍTICO**

- ✓ **MUESTRA:** Plasma pobre en plaquetas obtenido con citrato de sodio al 3.8% y conservado a -80°C hasta el momento de su procesamiento.
- ✓ **TÉCNICAS EMPLEADAS:** Electroforesis en gel de SDS-Agarosa, Electroblotting semi-seco, Reacción de revelado inmunoenzimático.
- ✓ **REACTIVOS NECESARIOS:**
  - SOLUCIONES BUFFER: Buffer para dilución de las muestras, Buffer Stacking-gel, Buffer de corrida, Buffer para el tanque de electroforesis, Buffer acetato, Buffer PBS-tween, Buffer de transferencia.
  - ANTICUERPOS: Rabbit Anti-Human Von Willebrand Factor Dako Cytomation (Code N°A 0082); Swine Anti-Rabbit HRP Dako Cytomation (Code N° P0217).
  - Agarosa tipo V
  - Membrana de nitrocelulosa
  - 3-amino-9-ethyl-carbazole
  - N,N-Dimethyl-formamide

- **PREPARACIÓN DE REACTIVOS**

I.- BUFFER PARA LAS MUESTRAS:

A) SOLUCION STOCK

1,211 gr de Tris base

0,3722 gr de EDTA de sodio (Na<sub>2</sub>)

Agua destilada CSP 100 mL

B) SOLUCION DE TRABAJO

Debe prepararse el mismo día, en este estricto orden:

9 ml de agua destilada

1 ml de la solución stock anterior

4,8 gr de urea

0,2 gr de lauryl sulfato (SDS)

Ajustar a pH=8

II.- BUFFER STACKING-GEL

1,544 gr de trizma base

0,1 gr de SDS

Agua destilada CSP 100 mL

Ajustar a pH 6,8

III.- BUFFER GEL DE CORRIDA

12,11 gr de Trizma base

0,2 gr de SDS

Agua destilada CSP 200 mL

Ajustar a pH 8,8

IV.- BUFFER TANQUE DE ELECTROFORESIS

12 gr Tris base

57,6 gr de glicina  
2 gr de SDS  
Agua destilada CSP 2000 mL  
Ajustar a pH=8,35

#### V.- BUFFER ACETATO

Solución A: Ácido acético glacial 0,1 N (5,7 mL en 1000 mL)  
Solución B: Acetato de sodio 0,1 N (13,61 gr en 1000 mL)  
Mezclar: 21 mL de solución A con 79 mL de solución B  
Ajustar a pH = 5,2

#### VI.- BUFFER PBS-TWEEN pH: 7,2

21,107 gr de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,1 M)  
14,199 gr de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0,1 M)  
5,844 gr NaCl (0,15 M)  
Agua destilada CSP 1000 ml  
1 mL Tween 20 (es al 0,1%)

#### VII.- BUFFER DE TRANSFERENCIA (sistema continuo)

1,46 gr de glicina  
2,90 gr de Tris-base  
0,1 gr de SDS  
100 mL metanol  
Agua destilada CSP 500 ml

- **PROCEDIMIENTO**

### 1.- Preparación del gel de agarosa

a) Gel de corrida (1.6 %)

50,0 mL del buffer gel

0,8 gr de agarosa tipo V (Sigma)

Vaciar en el soporte del gel (11,9 x 13.8 cm)

Permitir que enfríe hasta que se solidifique, para acelerar el proceso se puede colocar sobre una plancha fría.

Después de 15 minutos cortar la banda que dará espacio al stacking-gel.

b) Gel de concentración (stacking gel al 1%)

15 ml de buffer stacking gel

0,15 gr de agarosa tipo V (Sigma)

Colocar el peine para los pozos en la lámina plástica y añadir la agarosa fundida sobre el espacio de la banda cortada del gel de corrida.

Permitir que solidifique por aproximadamente 2 horas (en refrigeración); esperar al menos 15 minutos antes de mover la placa, para evitar que se derrame.

- **PREPARACIÓN DE MUESTRAS:**

Diluir cada muestra 1:5 con el buffer muestra (previamente preparado), de la siguiente manera:

130 λ buffer de muestra  
60 λ muestra  
10 λ bromofenol (al 1 % en agua destilada)

Incubar 30 minutos a 60 grados centígrados en baño de María (hacerlo en los últimos 30 minutos de incubación de los geles para que concluyan las incubaciones al mismo tiempo)

- **ELECTROFORESIS:**

- Colocar en cada pozo 30μL de las muestras diluidas, incluyendo en uno de ellos el control (pool de plasmas normales de Grupo A+, AB+ y O+).
- Realizar una primera corrida de 1 hora y media a 60 volts; la corrida se debe mantener en las mismas condiciones de voltaje hasta que las muestras avancen fuera del primer gel (stacking gel) y una segunda corrida por 17 horas a 30 volts.

**TRANSFERENCIA:**

- Al día siguiente, retirar el gel de la cámara, cortar los 3.8 cm correspondientes al stacking gel y eliminarlo en recipiente de residuos biológico infecciosos.
- El gel de corrida se coloca en un recipiente adecuado y se incuba con buffer de transferencia por 10 minutos en agitación constante.

- Se cortan 6 papeles filtro (0.8mm de grosor) y la membrana de nitrocelulosa con medidas de 9.5 cm x 12 cm, se colocan en recipientes adecuados y se incuban con buffer de transferencia por 10 minutos en agitación constante
- Formar el sándwich de transferencia en alguno de los cassette del equipo Trans turbo Blot como se describe a continuación:
  - ✓ Colocar 3 papeles de filtro,
  - ✓ Colocar la membrana de nitrocelulosa.
  - ✓ Colocar el gel de agarosa
  - ✓ Colocar 3 papeles de filtro,
  - ✓ Cerrar el cassette e introducir en el equipo Trans turbo Blot
- Correr el programa de transferencia durante 1 hora a 0.3 Amper y 10 volts.
- Una vez concluida la transferencia, incubar en leche descremada al 5%, durante 1 hora para bloquear el fondo inespecífico de proteína.
- Transferir la membrana de nitrocelulosa a un recipiente adecuado y eliminar los papeles filtro en el recipiente de residuos biológico infecciosos.
- Realizar a la membrana de nitrocelulosa 5 lavados con agua destilada con una duración de 3 minutos cada uno, en agitación constante.
- Lavar la membrana de nitrocelulosa con PBS-tween al 0,1% por 10 minutos en agitación constante.
- Incubar durante toda la noche con el anticuerpo primario (Rabbit Anti-Human Von Willebrand Factor Dako Cytomation)

Dil actual: 50 mL PBS-Tween en 100  $\mu$ L anti FvW

- Recuperar el anticuerpo primario y mantener en refrigeración a 4°C.
- Realizar 3 lavados con buffer-tween por 5 minutos cada uno, en agitación constante.
- Incubar 2 horas mezclando con el anticuerpo secundario (Swine Anti-Rabbit HRP Dako Cytomation)  
Dil actual: 50 mL PBS-Tween en 100 µL anti FvW
- Lavar en buffer acetato por 5 minutos en agitación constante.

**REVELADO POR COLORACIÓN CON DIETIL-CARBAZOL / DIMETILFORMAMIDA:**

- Preparar la solución enzima-sustrato (120 mg de dimetilformalina3-amino-9-ethyl-carbazole en 15 ml de N,N-Dimethyl-formamide).
- Realizar la mezcla de reacción
  - 70 ml buffer acetato preparado
  - Mezclar: 55 ml Acetato de Sodio
  - 15 ml Acido Acético Glacial
  - 5 ml de la sol. Enzima-sustrato preparada anteriormente
  - 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Incubar 1 hora en agitación constante protegiendo de la luz.
- Lavar en agua destilada y posteriormente guardar la imagen en archivo



### **REVELADO POR BIOLUMINISCENCIA (alternativo):**

Como una alternativa de mayor sensibilidad para la detección de la proteína por reacción con anticuerpos acoplados a peroxidasa de rábano (HRP) se probó un método de bioluminiscencia por el kit Immobilon Western (Millipore)<sup>™</sup> (Cat. WBKL50100) y la detección con un escáner por medio de una cámara refrigerada para el revelado de la reacción de anticuerpos por quimioluminiscencia. La digitalización de imagen se realiza por el programa Quantity-One de BioRad<sup>™</sup> con la selección del scanner ChemiDoc-XPS®.

El método consiste en el encendido previo de la cámara para su congelación por unos 15-20 min. Posteriormente se calcula en el scanner el tamaño de la imagen con un papel de acuerdo al de la membrana para ajustar la saturación completa de la imagen por la cámara. Se realiza la reacción enzima-sustrato (E-S) con los dos reactivos del kit Immobilon Western (Millipore)<sup>™</sup> aplicando un pequeño volumen en partes iguales de enzima y sustrato (750 µl). Para ello, la membrana de nitrocelulosa se monta sobre un vidrio limpio habiendo realizado previamente los pasos de transferencia e incubación con los anticuerpos primario y secundario-HRP y el enjuague con PBS-Tween. Una vez aplicados los reactivos E-S la membrana se cubre con film (kleen-pack) y se coloca en el scanner para realizar la detección de la señal con la cámara y digitalizar la imagen con el programa Quantity-One de BioRad<sup>™</sup> seleccionando la función de detección de quimioluminiscencia con una exposición de 180-540 seg.

**FUNDAMENTO DEL ANÁLISIS DE MULTÍMEROS:** La solución de trabajo empleada para la preparación de las muestras desnatura las proteínas del plasma para permitir el corrimiento del FvW con los dominios expuestos de acuerdo a su composición multimérica. Al colocar las muestras en los pocillos del gel de menor concentración y a mayor voltaje, se pretende

concentrarlas y uniformar el frente de corrimiento. Posteriormente a menor voltaje para impedir la distorsión de las proteínas, la migración del FvW evidencia la distribución de multímeros (gel de baja resolución, 1.3%) o la composición de los mismos (gel de alta resolución, 1.6%). Al terminar el corrimiento, las proteínas son transferidas por un método semiseco de forma ultra-rápida por un equipo automatizado a una membrana de nitrocelulosa, cuyas propiedades de carga eléctrica y composición, permiten que las proteínas se unan de manera no covalente mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbicas ( $250\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ), para contar con un medio para realizar la detección específica del FvW del resto de proteínas plasmáticas por medio de una reacción inmune. Para ello, se bloquea la membrana con leche descremada para evitar señal de fondo inespecífica previo a la incubación con los anticuerpos. Inicialmente la membrana se incuba por 18hrs (toda la noche) con el anticuerpo primario de conejo anti-FvW humano y posteriormente por dos horas con un anti-anticuerpo de cerdo anti-conejo anti-FvW humano, acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) para amplificar la señal inmunológica que es revelada con un reactivo enzima-sustrato conteniendo peróxido de hidrógeno con el que reacciona la peroxidasa.

La mezcla de reacción utilizada en la coloración permite revelar el patrón de multímeros del FvW específicamente a partir de los plasmas problema y en contraste con plasmas normales de distinto grupo sanguíneo (O, A, AB) para corregir la valoración de los niveles plasmáticos de FvW determinados por dichos antígenos.