



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



QUÍMICA FARMACEÚTICA BIOLÓGICA

“Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de von Willebrand y sus subtipos en pacientes mestizos mexicanos”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACEÚTICO
BIOLÓGO

PRESENTA

pQ.F.B. Paola Itzel Carmona Olvera

Director (es) de tesis:

Director externo: D. en C. Jesús Hernández Juárez

Directora interna: Q.F.B. Patricia Vidal Millán

Febrero 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis del Hospital General Regional No. 1 Carlos MacGregor Sánchez Navarro del IMSS, bajo la dirección del D. en C. Jesús Hernández Juárez, Investigador colaborador en la Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis., y la Q.F.B. Patricia Vidal Millán, Profesora de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Dedico con mucho cariño esta tesis a esas personitas muy importantes en mi vida, mis padres, mi hermana y mis abuelos:

Mario

Lupita

Cari

Lila

Memo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente y de todo corazón a:

Dr. Abraham Majluf, por darme la oportunidad de aprender mucho de él como profesional y como persona durante la elaboración de esta tesis y colaboración de otros proyectos, me siento una persona privilegiada y sabe usted que lo he llegado a apreciar demasiado.

D. en C. Jesús, por todo el apoyo brindado, las enseñanzas recibidas y amistad otorgada a lo largo del proyecto, eres una excelente persona y un ejemplo a seguir para mí.

Q.F.B. Paty Vidal, por la entrega en cada clase, fomento mi gusto por la Hematología Clínica y las ganas de seguir estudiando, así como su ayuda en este proyecto, la aprecio demasiado profesora.

Mis Sinodales, M. en C. Roberto Cruz González Meléndez, Q.F.B. Pablo Juárez de los Santos y Q.F.B. Miriam Hinojosa Morales por sus comentarios e interés de la tesis.

Q.B.P. Omar Armando García, por la gran oportunidad que me brindaste desde que llegue al CSC para aplicar y ampliar mis conocimientos en el área clínica, pero sobre todo por todos los aprendizajes y amistad sin igual.

Mis compañeros y amigos de la UIMTHA, **Memo, Juli, Pame, Rafa, Alinks, Clau, Alicia, Adriana, Edmundo, Manuel**, así como a mis amigos de la facultad, **Ceci, Nalle, Justo, Eli, Fercho, Saúl, Gladis, Xavi, Carlos, Marce, Mariana y Tona**, por las enseñanzas y consejos recibidos de cada uno de ellos, las clases de estudio en la facultad y los momentos de diversión, los aprecio muchísimo, saben que cuentan conmigo. **Pero sobre todo a mi familia por el enorme apoyo brindado a lo largo de mi camino académico y profesional.** A todas esas personas que me ayudaron y también a las que me pusieron el pie, gracias por impulsarme a seguir adelante.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.	1
II. MARCO TEORICO.	2
a. Hemostasia.	2
i. Hemostasia primaria.	2
ii. Hemostasia secundaria.	3
iii. Fibrinólisis.	4
b. Factor de von Willebrand.	4
c. Enfermedad de von Willebrand.	7
i. Enfermedad de von Willebrand tipo 1.	8
ii. Enfermedad de von Willebrand tipo 2A.	8
iii. Enfermedad de von Willebrand tipo 2B.	9
iv. Enfermedad de von Willebrand tipo 2M.	9
v. Enfermedad de von Willebrand tipo 2N.	10
vi. Enfermedad de von Willebrand tipo 3.	10
d. Antecedentes.	10
III. PROBLEMA DE INVESTIGACION.	12
a. Planteamiento del problema y justificación.	12
b. Importancia del estudio.	13
c. Limitaciones del estudio.	14
IV. OBJETIVOS.	14
V. METODOLOGIA.	15
a. Muestra biológica.	15
i. Universo de trabajo.	15
ii. Tipo de estudio.	15
iii. Descripción de las variables.	15
iv. Descripción operacional de las variables.	15
v. Tamaño de la muestra.	16
vi. Criterios de inclusión.	16
vii. Criterios de no inclusión.	16

viii.	Criterios de exclusión.	16
b.	Métodos.	17
i.	Recolección de las muestras.	17
ii.	Pruebas de laboratorio.	18
1.	Grupo sanguíneo y factor Rh.	18
2.	Tiempo de protrombina.	19
3.	Tiempo de tromboplastina parcial activada.	19
4.	Correcciones y diluciones.	20
5.	Fibrinógeno de Clauss.	20
6.	Tiempo de hemorragia.	21
7.	Cuenta plaquetaria y volumen plaquetario medio.	22
8.	Actividad del factor VIII.	23
9.	Antígeno del factor de von Willebrand.	23
10.	Actividad de cofactor de ristocetina.	24
11.	Relación función/concentración del factor de von Willebrand.	24
12.	Ensayo de RIPA.	25
13.	Análisis de los multímeros del factor de von Willebrand.	27
c.	Análisis estadístico.	28
VI.	RESULTADOS.	29
VII.	DISCUSIÓN.	44
VIII.	CONCLUSIONES.	53
IX.	PERSPECTIVAS.	55
X.	CONSIDERACIONES ÉTICAS.	55
XI.	BIBLIOGRAFIA.	56
XII.	ANEXOS.	62
a.	Técnica del análisis electroforético de los multímeros del vWF.	62
b.	Antecedentes de algoritmos para diagnóstico de EvW.	67
c.	Propuesta de algoritmo diagnóstico en laboratorio de EvW en México.	70
d.	Hoja de información del estudio.	71
e.	Hoja de aceptación del estudio.	72

I. INTRODUCCIÓN.

La enfermedad de von Willebrand (EvW) es el desorden hemorrágico hereditario más frecuente en el mundo, su prevalencia es cercana al 1%.¹

La EvW se origina por la deficiencia cuantitativa o cualitativa del factor de von Willebrand (vWF).² La prevalencia de EvW pudiera ser mayor debido a que por lo general los casos leves no se diagnostican. El primer reporte de EvW fue en 1926, por el doctor Erik von Willebrand, quien publicó el caso de una familia que vivía en una isla de Finlanda, donde los miembros presentaban epistaxis y hemorragias graves que conllevaron a la muerte de cada uno de ellos. Evidentemente, este hecho sugirió que se trataba de una enfermedad diferente de la hemofilia. El doctor von Willebrand describió que los pacientes presentaban tiempos de sangrado prolongados, a pesar de tener un recuento plaquetario normal y mostraban un modo de transmisión autosómico dominante de la enfermedad, llamándola pseudohemofilia.³

Para 1928, el doctor George Minot de Boston describió a 5 pacientes de 2 familias con síntomas similares y tiempo de sangrado prolongado. Durante los años 50 y 60 quedó demostrado que este trastorno por lo general estaba relacionado con un nivel reducido de la actividad procoagulante del factor VIII (FVIII) y que esta deficiencia podía compensarse mediante la infusión de plasma. En 1971, se demostró por primera vez, mediante pruebas inmunológicas, que el FVIII y el vWF eran proteínas distintas. Esto ayudo a diferenciar entre la hemofilia A (HA) y la EvW.^{3,4} Para los años 80 y en adelante, se han recurrido a diferentes técnicas para conocer más de este trastorno, las cuales han ayudado a su clasificación como a su diagnóstico en diferentes países, incluido México.

II. MARCO TEÓRICO.

La hemostasia representa el cese fisiológico de la hemorragia por un mecanismo complejo que involucra un cambio de estado físico de la sangre, de líquido a sólido mediante la formación de fibrina; mientras que la coagulación sanguínea, cascada de la coagulación, hemostasia secundaria o fase plasmática de la hemostasia consiste de una serie de reacciones enzimáticas que finalizan con la formación de trombina, siendo esta solo una parte fundamental en la hemostasia.⁵

a. Hemostasia.

La hemostasia tiene como objetivos:

- Mantener la integridad vascular y fluidez de la sangre.
- Detener la hemorragia.

Para que la hemostasia se lleve a cabo se requiere de distintos componentes esenciales:

1. Endotelio y plaquetas (hemostasia primaria).
2. Factores procoagulantes.
3. Proteínas anticoagulantes.
4. Sistema fibrinolítico.

Los primeros dos componentes son considerados como eventos cronológicos, pero muchos de estos procesos se llevan a cabo en paralelo. A pesar de este conocimiento, los términos hemostasia primaria y secundaria son de gran utilidad para fines educativos.⁶

i. Hemostasia primaria.

La hemostasia primaria involucra al sistema vascular que favorece el cierre de la lesión por vasoconstricción mediada por el endotelio (segregación de serotonina y tromboxano A_2 (TxA_2)) y a los procesos de activación, adhesión y agregación plaquetaria.^{6,7} El vWF es un

componente esencial de la hemostasia primaria al participar en la adhesión y agregación plaquetaria. Además, el vWF participa en la hemostasia secundaria al transportar y proteger al FVIII de la degradación proteolítica.

ii. Hemostasia secundaria.

La hemostasia secundaria comprende la activación de distintas enzimas en dos diferentes vías, denominadas extrínseca e intrínseca. Sin embargo, es importante hacer notar que los términos vía intrínseca y extrínseca siguen siendo útiles sólo para el laboratorio clínico, ya que fisiológicamente los mecanismos de producción de trombina son diferentes.

La vía extrínseca inicia después de que el endotelio es lesionado o activado, el factor tisular (FT) expuesto o expresado en el endotelio activa al factor VII (FVIIa), en presencia de Ca^{++} formando un complejo que más adelante activará a otras moléculas de FVII y de factor X (FX) iniciando así la generación de trombina. Además, el FVIIa activa al factor IX (FIXa) en un mecanismo independiente de la vía intrínseca.

Por otro lado, la vía intrínseca de la hemostasia mantiene y amplifica la formación de trombina.

La vía intrínseca inicia cuando el factor XII (FXII), el cininógeno de alto peso molecular (HWMK), la precalicreína y el factor XI (FXI) reaccionan con superficies de carga negativa dando lugar a la activación del FXI (FXIa), el cual a su vez activará al FIX (FIXa).

El FIXa convierte al FVIII en FVIII activado (FVIIIa) sin embargo, desde hace algunos años se sabe que la activación del FVIII ocurre inicialmente por efecto de la trombina producida en la vía extrínseca. El FVIIIa, en presencia de FIXa, Ca^{++} y fosfolípidos de las plaquetas

activadas comprenden el complejo diezasa, el cual activa al FX (FXa) para generar grandes cantidades de trombina que garanticen la formación de la malla de fibrina.⁸

iii. Fibrinólisis.

El sistema fibrinolítico tiene como objetivo degradar el coágulo de fibrina una vez que el tejido dañado ha sido reparado. La fibrinólisis depende de una enzima proteolítica muy potente denominada plasmina. Esta enzima degrada a la fibrina en pequeños segmentos solubles conocidos como productos de degradación de la fibrina (PDF).⁸

b. Factor de von Willebrand.

El vWF es una glicoproteína plasmática que se sintetiza en el endotelio y los megacariocitos.⁹ Su gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 12, contiene 52 exones compuestos de 178 kilobases que darán origen a una proteína madura de 2050 aminoácidos que corresponde al vWF maduro.¹⁰

La subunidad más pequeña del vWF tiene un PM de 220 kDa, sin embargo el dímero es la subunidad más pequeña de esta proteína en el plasma (PM = 440 kDa). Sin embargo, después de la polimerización del vWF se forman macromoléculas (o multímeros) de hasta 20,000 kDa de PM. El 18% de la estructura del vWF está constituido por carbohidratos.⁶

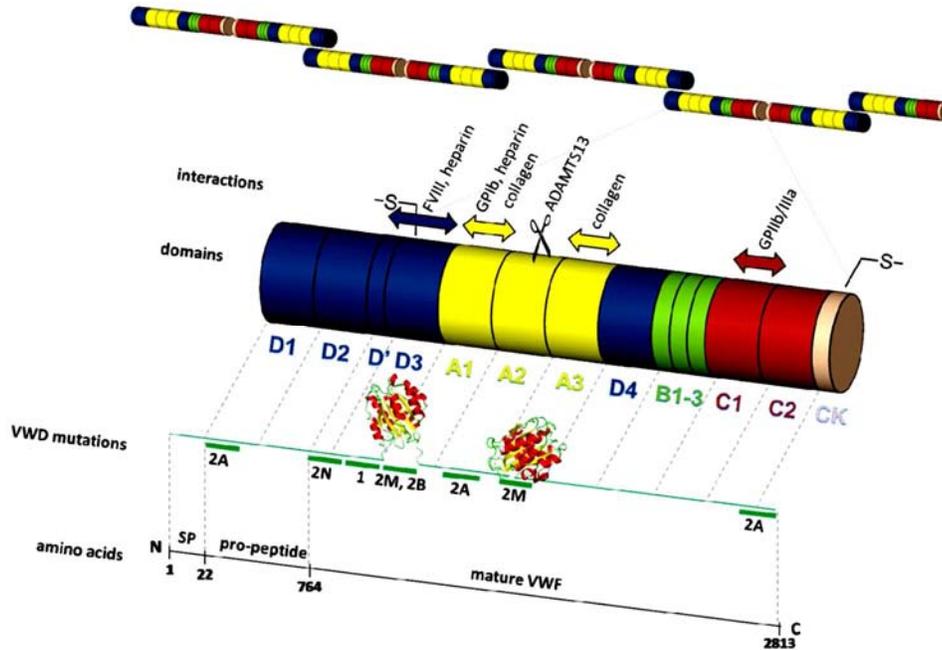


Fig 1. Estructura del vWF. Se observan los dominios del vWF, las alteraciones en estos dominios condicionan los diferentes subtipos de la EvW ¹¹.

Como producto de la transcripción del gen del vWF, se obtiene el pre-pro-vWF, que se compone de 2813 aminoácidos, dividido en cuatro tipos de dominios: tres dominios A, tres dominios B, dos dominios C y cuatro dominios D. El dominio A1 es el sitio de unión del vWF con el receptor Iba en las plaquetas y para el colágeno, heparina, glicolípidos sulfatados y algunos venenos de serpientes. El dominio A2 tiene el sitio de reconocimiento para la metaloproteasa ADAMTS-13, mientras que el A3 tiene el sitio de unión para el colágeno tipo I y III. El dominio C1 tiene el sitio de unión para la integrina α IIb β 3.¹⁰

Los dominios D' y D3 exhiben los sitios de unión al FVIII y heparina, mientras que los dominios D1 y D2 conforman el pre-propéptido del vWF, siendo estos últimos muy importantes en la maduración del vWF. En el retículo endoplasmático las subunidades de pro-vWF se homodimerizan entre residuos c-terminales mediante puentes disulfuro. Los

dímeros del vWF son transportados al aparato de Golgi donde sufren diferentes modificaciones, tales como la eliminación proteolítica del péptido del vWF y las uniones de compuestos en los extremos N y O. En el aparato de Golgi, los dímeros del vWF se multimerizan y se secretan constitutivamente por las células endoteliales o se almacenan en los cuerpos de Weibel-Paley para su secreción inducida. Además, el vWF se sintetiza en los megaracilocitos, y se almacena en los gránulos α de las plaquetas. En el plasma el vWF circula como una mezcla de multímeros de diferentes pesos moleculares⁶, siendo los de mayor peso molecular los indispensables para el control de la hemostasia.¹²

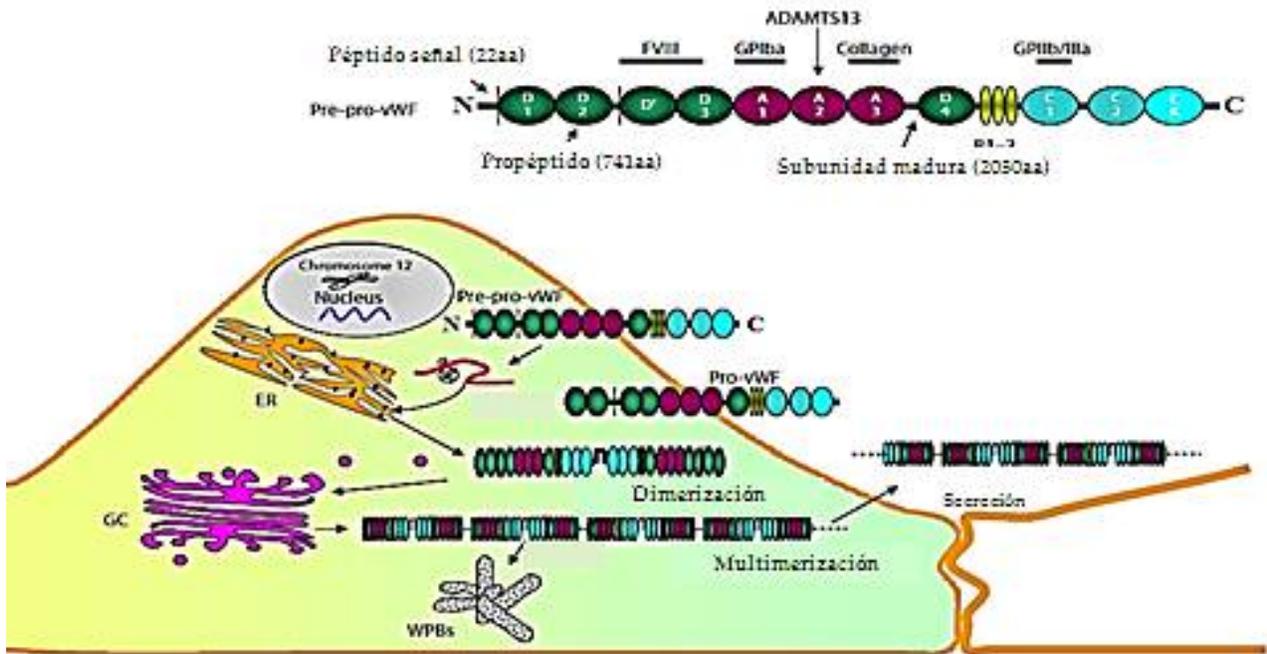


Fig 2. Síntesis del vWF (modificado de Luo PG y cols, 2012).¹²

El vWF tiene tres funciones principales:

- Mediar la adhesión plaquetaria: unión del vWF a la GPIIb/IX/V de las plaquetas, que permite al vWF actuar como mediador en la adhesión de las plaquetas (sólo las

formas de alto peso molecular permiten la adhesión estable) al subendotelio que ha sido expuesto durante la lesión del endotelio.

- Mediar la agregación plaquetaria: unión entre plaquetas a través de la interacción del vWF con la GPIIb/IIIa en la membrana plaquetaria.
- Transportar al FVIII en el plasma: la formación del complejo FVIII/vWF preserva la actividad de este factor al protegerlo de la degradación proteolítica.¹⁰

Investigaciones recientes sugieren que el vWF puede tener otras funciones no hemostáticas, como en la angiogénesis, la proliferación de células del músculo liso, la metástasis de células tumorales, así como la regulación de la inmunidad celular.¹²

c. Enfermedad de von Willebrand.

La EvW es la coagulopatía hereditaria más frecuente, que afecta a cerca del 1% de la población mundial, debido a alteraciones del gen del vWF en el cromosoma 12 que propicia la deficiencia cualitativa o cuantitativa de esta proteína. La publicación más reciente de la Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis respecto a la clasificación de la EvW se realizó en el 2006, considerando como un rasgo cuantitativo a los tipos 1 y 3, y como cualitativo al tipo 2.⁴

Los síntomas más frecuentes en EvW son la epistaxis, menorragia y sangrados en el tracto gastrointestinal.¹¹

i. Enfermedad de von Willebrand tipo 1.

Es el tipo más frecuente de esta enfermedad, representa cerca del 80% de todos los casos. La sintomatología clínica depende del nivel de deficiencia del vWF. Se transmite como rasgo autosómico dominante.⁴ Se origina por mutaciones del gen que alteran el dominio D3 del vWF haciendo que esta molécula se retenga intracelularmente afectándose su concentración plasmática.³

Los pacientes con EvW tipo 1 presentan niveles plasmáticos bajos del antígeno del vWF (VWF:Ag), actividad del cofactor de ristocetina (VWF:RCo), capacidad de unión al colágeno (VWF:CB), así como presencia de todos los multímeros (bajo, intermedio y alto peso molecular) de esta proteína. En la práctica, un nivel bajo del VWF:Ag, y valores superiores de 0.7 para las relaciones VWF:RCo:VWF:Ag y VWF:CB:VWF:Ag, son indicativo de EvW tipo 1.¹³

Su diagnóstico se facilita en los pacientes que presentan historia familiar de hemorragias excesivas, tiempo de sangrado prolongado, niveles bajos del VWF:Ag y resultados normales para la aglutinación plaquetaria inducida con ristocetina (RIPA).³

ii. Enfermedad de von Willebrand tipo 2A.

Subtipo más frecuente de la EvW tipo 2 que se hereda de manera autosómica dominante. Se caracteriza por una pérdida de la función del vWF debido a la ausencia de los multímeros de alto e intermedio peso molecular de la proteína (deficiencia cualitativa). Lo anterior se origina por mutaciones en el gen del vWF que inducen cambios a nivel del propéptido o en el dominio A2, afectando la polimerización del vWF o incrementando la susceptibilidad a la proteólisis por ADAMTS-13, respectivamente.¹¹

El diagnóstico de EvW tipo 2A no es complicado, ya que los niveles plasmáticos de VWF:RCo y VWF:CB están disminuidos, el tiempo de sangrado prolongado y RIPA disminuida. Además, en el análisis electroforético del vWF los multímeros de intermedio y alto peso molecular no están presentes.³

iii. Enfermedad de von Willebrand tipo 2B.

Este subtipo se hereda de manera autosómica dominante, usualmente por mutaciones sin sentido en el dominio A1, provocando un incremento en la afinidad del vWF al receptor GPIIb plaquetario (hiperagregabilidad). En consecuencia, se forman aglomerados plaquetarios los cuales son removidos del organismo, eliminando así, a los multímeros de alto peso molecular del vWF. Además, la afinidad alta del vWF a las plaquetas induce trombocitopenias leves a moderadas en los pacientes con EvW tipo 2B.

Para diagnosticar a estos pacientes en el laboratorio y diferenciarlos de aquellos con EvW tipo 2A, las pruebas de laboratorio que resultan esenciales son la electroforesis de los multímeros del vWF y RIPA. En la primera prueba se demuestra la ausencia de los multímeros de alto peso molecular y en la segunda, que la aglutinación plaquetaria se desarrolla incluso a bajas concentraciones de ristocetina, lo que evidencia la afinidad alta del vWF a las plaquetas.³

iv. Enfermedad de von Willebrand tipo 2M.

La EvW tipo 2M se hereda de manera autosómica dominante, y se caracteriza por una afinidad baja del vWF a las plaquetas principalmente, pero también por una baja afinidad al colágeno. Sin embargo, a diferencia de los subtipo A y B, los pacientes con EvW tipo 2M no

carecen de los multímeros de intermedio y alto peso molecular. Este subtipo de EvW se asocia con mutaciones en el dominio A1 y A3 del vWF.¹¹

En estos pacientes, se observan valores bajos de VWF:RCo o VWF:CB, y presencia de todos los multímeros del vWF.³

v. Enfermedad de von Willebrand tipo 2N.

Único subtipo de EvW tipo 2 que se hereda de manera autosómica recesiva, caracterizada por una deficiencia en la afinidad del vWF al FVIII debido a mutaciones en los dominios D' y D3.¹¹

Los pacientes presentan niveles muy bajos del FVIII, similares a un paciente con HA, pero con valores normales o ligeramente bajos de VWF:Ag y de VWF:RCo.³

vi. Enfermedad de von Willebrand tipo 3.

El tipo 3 de la EvW se hereda de manera autosómica recesiva, siendo la forma más severa de la enfermedad, con una prevalencia alta en la India e Irán. Es causada por una alteración en la síntesis del vWF (cuantitativa) que origina que los niveles plasmáticos de la proteína sean casi indetectables en muchos pacientes.

Los pacientes manifiestan graves hemorragias mucocutáneas recurrentes, los valores de VWF:Ag, VWF:RCo y FVIII son indetectables en algunos casos.¹¹

d. Antecedentes.

En México el estudio de EvW inicio apenas hace unos años, ya que se tenía la creencia de que esta enfermedad no se encontraba en la población mexicana.

En 1996 se reportó un estudio, en el cual se realizó un análisis multimérico del vWF, con el objetivo de confirmar el diagnóstico y clasificación de la enfermedad. Además, se estimó que la prevalencia de la enfermedad era muy inferior a las cifras reportadas en la población de origen europeo. Cabe mencionar que el número mayor de casos de EvW ha sido reportado por el IMSS, con 60 pacientes en 24 familias, sin embargo su incidencia sigue sin conocerse.¹⁴

En el 2006 se realizó un estudio para diferenciar el tipo 2N de la EvW de la hemofilia A, pero no fue hasta 2012, que se dio a conocer en la revista Haemophilia que realmente existía esta enfermedad en la población mestiza mexicana.

Recientemente (2014), en un intento de contribuir al diagnóstico de EvW en México, se publicó un estudio en el cual se da a conocer que si están presentes todos los tipos de EvW en la población mexicana, además, plantea una nueva estrategia metodológica para realizar el análisis multimérico del vWF de acuerdo a las posibilidades del país. También se dio a conocer una guía rápida para el diagnóstico de EvW realizada por diferentes instituciones del sector salud (SEDENA, IMSS, ISSSTE). Sin embargo, es evidente y lamentable las carencias que se presentan en dicha guía, principalmente cuando se especifica los pasos a seguir en el diagnóstico de laboratorio.

III. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.

a. Planteamiento y justificación.

Es interesante observar que la mayor parte de la información actual sobre la biología del vWF y la EvW se deduce a partir de estudios realizados en países desarrollados, con una población predominantemente caucásica. Los datos sobre la epidemiología de EvW en los países en desarrollo son limitados, aunque aproximadamente el 80% de la población del mundo vive en estos países.¹¹

Durante muchos años, se pensó que la EvW era exclusiva de poblaciones caucásicas. Como resultado, en países no desarrollados como México, los pacientes con sospecha clínica de EvW son diagnósticos erróneamente por médicos y laboratorios clínicos con padecimientos como HA, púrpura trombocitopénica refractaria hereditaria, anticoagulante lúpico, entre otros. A pesar de que en la actualidad se sabe que en México la EvW está presente, el diagnóstico de laboratorio se realiza de manera inadecuada en casi todos los laboratorios del país. En gran medida, esto se debe a que la EvW es considerada casi siempre (laboratorios y médicos) como una derivación de la hemofilia clásica, lo cual representa quizá la limitante más importante en el diagnóstico de las alteraciones del vWF. Por todo lo anterior, el presente estudio tiene como principal objetivo diagnosticar a pacientes con sospecha clínica de EvW. Como segundo objetivo y no menos importante, se busca introducir a los laboratorios clínicos al diagnóstico idóneo de la EvW. Sin embargo, tengo presente que para que los laboratorios clínicos diagnostiquen adecuadamente a esta enfermedad hemorrágica es necesario hacer conciencia al personal que labora en el sector salud sobre esta enfermedad, llevándonos a las siguientes preguntas ¿Qué tanto es conocida la EvW? ¿Cómo se diagnostica la EvW en

México? ¿Qué medidas preanalíticas, analíticas y postanalíticas se siguen en el diagnóstico de EvW? Evidentemente, para que estos objetivos se lleven a cabo, es necesario que los resultados que se obtengan del presente estudio sean publicados en una revista científica accesible para que los profesionistas de laboratorio interesados en los trastornos hematológicos se informen sobre el diagnóstico adecuado de EvW.

Por todo lo anterior, me he planteado la siguiente pregunta de investigación, ¿qué porcentaje de pacientes con sospecha clínica de EvW tienen esta enfermedad?

Los resultados que se obtengan del estudio tendrán una aplicación inmediata, ya que con el diagnóstico de EvW los pacientes podrán recibir el tratamiento adecuado acorde al tipo de la enfermedad. En muchas ocasiones es sorprendente escuchar que pacientes con HA, de madres con historia de hemorragia recurrente, no responden adecuadamente a la administración de FVIII o viceversa, que pacientes con EvW no responden al tratamiento incluso cuando el tratamiento se basa en el empleo de concentrados plasmático altamente purificados de FVIII.

b. Importancia del estudio.

Se diagnosticó adecuadamente a pacientes con sospecha clínica de EvW, haciendo uso de pruebas específicas y de escrutinio en el laboratorio clínico, que permiten a los pacientes recibir la atención médica requerida, así como el tratamiento específico de acuerdo con el subtipo de la enfermedad que presenten.

c. Limitaciones.

1. Diferencias en los resultados del VWF:Ag en individuos aparentemente sanos, así como en la mayoría de los individuos con EvW, dando lugar a confusiones entre los individuos afectados con la enfermedad (VWF:Ag normales o bajos) y los no afectados (VWF:Ag, valores limítrofes e incluso bajos).
2. El vWF es un reactante de fase aguda, por lo que puede aumentar en momentos de estrés, enfermedad e infección, así como durante el embarazo.
3. Muchos de los ensayos utilizados para identificar EvW, particularmente VWF:RCo, muestran un alto grado de variabilidad analítica, es decir, diferentes resultados de la muestra en un mismo laboratorio o entre diferentes laboratorios.
4. En ensayos como el VWF:RCo, el límite inferior de detección es inapropiado (10-20 UI/dL), lo que dificulta el diagnóstico en pacientes en los que se sospecha de EvW tipo 3 o tipo 1 grave. Principalmente, esto ocurre cuando el VWF:RCo se determina por inmunoensayo de látex.
5. La realización de los multímeros de vWF podría ayudar al diagnóstico de EvW y prevenir diagnósticos erróneos, sin embargo, esta prueba no aporta información relevante cuando se sospecha de EvW tipo 2N, o para diferenciar entre EvW tipo 1 y tipo 2M.²

IV. OBJETIVOS.

Objetivo general:

Establecer el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand en pacientes mestizos mexicanos con sospecha clínica de esta enfermedad.

Objetivos específicos:

- Establecer el diagnóstico de los tipos de la enfermedad de von Willebrand en pacientes mestizos mexicanos.
- Establecer un algoritmo diagnóstico para el estudio de la enfermedad de von Willebrand en los laboratorios clínicos de México.

V. METODOLOGÍA.

a. Muestra biológica.

i. Universo de trabajo.

Pacientes con historia hemorrágica recurrente y sospecha clínica de EvW.

ii. Tipo de estudio.

Descriptivo, prospectivo, transversal y observacional.

iii. Descripción de las variables.

- Dependiente: Enfermedad de von Willebrand.
- Independiente: Diagnóstico de laboratorio.

iv. Descripción operacional de las variables.

Diagnóstico de laboratorio de la EvW: se refiere a las pruebas realizadas en el laboratorio clínico necesarias para evaluar fenotípicamente alteraciones cuantitativas o cualitativas del vWF, con el objetivo de confirmar o descartar la EvW.

Enfermedad de von Willebrand: es la enfermedad hemorrágica más frecuente en el mundo, afecta a cerca del 1% de la población mundial. Esta enfermedad se debe a alteraciones en el cromosoma 12 (gen del vWF) y otros factores genéticos y/o ambientales que inducen cambios en los niveles plasmáticos del vWF o en su función.⁴

v. Tamaño de la muestra.

Se analizaron las muestras de 116 pacientes con sospecha clínica de EvW, las cuales acudieron a la UIMTHA para confirmar el diagnóstico.

vii. Criterios de inclusión.

Pacientes con sospecha clínica de EvW.

viii. Criterios de no inclusión.

- Pacientes diagnosticados con alguna otra alteración hemostática.
- Mujeres embarazadas y/o con tratamiento hormonal.
- Pacientes con infecciones conocidas en el momento de la toma de muestra.
- Pacientes con uso de desmopresina o derivados plasmáticos.

ix. Criterios de exclusión.

- Muestras ictericas, hemolizadas y lipémicas.

b. Métodos.

i. Recolección de las muestras.

Los pacientes fueron reclutados por médicos hematólogos expertos en alteraciones del sistema de coagulación. Se contó con el apoyo de médicos hematólogos del área metropolitana del Distrito Federal y de los Estados de México, Puebla, Veracruz, Hidalgo, Querétaro y Sinaloa. Los pacientes fueron invitados a asistir a la UIMTHA del IMSS, donde se les dio las indicaciones necesarias para acudir a la toma de muestras (ayuno mínimo de 8 h y máximo de 12 h, evitando el consumo de alimentos altos de grasas, etc). En el caso de las mujeres en edad reproductiva, se les solicitó que asistieran a la toma de muestras durante su periodo menstrual.

Se tomaron las muestras sanguíneas de máximo 5 pacientes por día, durante un periodo de 8 semanas. Se procedió a extraer aproximadamente 20 mL de sangre venosa (5 tubos de 2.7 mL con citrato de sodio al 0.109 M y 1 tubo más de 4 mL con EDTA). La sangre recolectada en los tubos con citrato de sodio se centrifugó a 2500 g durante 15 minutos para obtener plasma pobre en plaquetas (PPP). Se fraccionaron alícuotas en viales de plástico de 1.5 y 0.5 mL, e inmediatamente después se preservó el PPP a -70 C hasta su procesamiento. Por otro lado, la sangre recolectada en el tubo con EDTA se usó para la determinación del volumen plaquetario medio y la cuenta plaquetaria.

Para los pacientes en los que se requería la determinación de RIPA, se les realizó una segunda toma de muestras con el objetivo de obtener plasma rico en plaquetas (PRP) y PPP. Se recolectaron 10.8 mL de sangre en 4 tubos con citrato de sodio, la obtención del PRP se obtuvo centrifugando la sangre a 800 g durante 10 min, por su parte la obtención

del PPP se realizó usando un remanente del PRP el cual se centrifugó a 1500 g durante 10 min. El ensayo de RIPA se realizó en las siguientes 4 h después de la toma de las muestras.¹⁵

ii. Pruebas de laboratorio.

Para el diagnóstico de EvW se realizaron pruebas de escrutinio, específicas y discriminatorias.

- Pruebas de escrutinio: conteo plaquetario, tiempo de hemorragia estandarizado, tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa), tiempo de protrombina (TP) y fibrinógeno.
- Pruebas específicas: VWF:Ag, VWF:RCo, y actividad del FVIII.
- Pruebas discriminatorias: RIPA, análisis multimérico del vWF.^{4,16}

1. Grupo sanguíneo y factor Rh.

Actualmente se sabe que el grupo sanguíneo se asocia con los niveles plasmáticos del vWF. Los individuos con grupo sanguíneo 0 presentan niveles medios del VWF:Ag de aproximadamente 75 UI/dL, mientras que en individuos de grupos sanguíneos A, B o AB la media oscila en 123 UI/dL.¹⁷ De ahí la importancia de realizar esta prueba durante el proyecto.

Se ocuparon los glóbulos rojos de cada paciente para determinar el grupo sanguíneo utilizando antisueros específicos.

2. Tiempo de protrombina (TP).

Prueba que evalúa la función de los factores II, VII, X, V, además vigila la terapia con anticoagulantes orales.¹⁸ El TP mide el tiempo necesario para que se forme un coágulo después de agregar una parte de plasma previamente incubado a 37°C/ 180", para posteriormente adicionar una parte de tromboplastina completa y otra de cloruro de calcio de concentración conocida.¹⁹

El control normal tiene un valor entre 10 y 12 segundos, dependiendo de la marca de reactivos usada. Generalmente el TP se prolonga cuando existe menos de 30% de actividad de alguno de los factores involucrados, presencia de heparina, presencia de productos de degradación fibrinógeno-fibrina, presencia de algún inhibidor hacia los factores involucrados, insuficiencia hepática, deficiencia de vitamina K y síndrome nefrótico.^{7,19}

Se utilizó una técnica coagulométrica automatizada y se consideraron valores normales aquellos que tuvieron una diferencia de 2 a 3 s con respecto al plasma testigo.

3. Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa).

Prueba que evalúa la función de los factores VIII, IX, XI, X, V y II. El TTPa es el tiempo que tarda en coagular el plasma incubado con cefalina y caolín, contado desde el momento de la recalcificación *in vitro*.⁷

Generalmente se observa un resultado prolongado debido a la reducción de factores de la vía intrínseca, presencia de heparina, productos de degradación fibrinógeno-fibrina, presencia de algún inhibidor, así como en algunas situaciones clínicas como las hemofilias A, B, C, parahemofilia, EvW e insuficiencia hepática.^{7,19}

Se utilizó una técnica coagulométrica automatizada que consiste en adicionar de una mezcla de cefalina liofilizada (sustituto plaquetario preparado de tejido cerebral de conejo) y suspensión de caolín como activador a la muestra de plasma anticoagulado con citrato de sodio 3.2 %; se incubó de 2-3 min y se adicionó el cloruro de calcio 0.025 M para medir el tiempo que tarda en formarse la malla de fibrina. Se consideraron valores normales aquellos que tuvieron una diferencia de 3-5 s con respecto a un testigo.²⁰

4. Correcciones y diluciones.

Las muestras de los pacientes con resultados prolongados del TP y/o TTPa se estudiaron con mayor profundidad para determinar la causa de la anomalía mediante ensayos de mezcla del plasma del paciente con un plasma testigo (mezcla de plasmas de donadores de sangre, 10 hombres y 10 mujeres). Con estos ensayos se puede conocer si la prolongación de los tiempos de coagulación se debe a una deficiencia en algunos de los factores hemostáticos o por la presencia de un inhibidor. Si después de mezclar el plasma del paciente con el plasma testigo el tiempo de coagulación se normaliza, se entenderá que el plasma testigo proporcionó el factor deficiente al plasma problema, de lo contrario, se sospecha de un inhibidor, el cual inhibe directa o indirectamente la actividad de los factores hemostáticos presentes en la mezcla del plasma problema con el plasma testigo.²¹

5. Fibrinógeno de Clauss.

El método de Clauss representa el estándar de oro para la determinación de la concentración de fibrinógeno. Se fundamenta en la determinación cuantitativa de fibrinógeno en el plasma. Esta prueba se determinó usando un coagulómetro automatizado

(BCSXP Siemens, kit Multifibrin U) el cual adiciona un exceso de trombina de concentración conocida (200µL) al plasma problema previamente incubado (100µL/1min) y se registra el tiempo requerido para formar el coágulo.

Cada laboratorio debe establecer su valor de referencia sin embargo, la concentración de fibrinógeno oscila normalmente entre 150 y 450 mg/dL.^{7, 22}

6. Tiempo de hemorragia (TH).

El TH o sangrado es el tiempo entre la realización de una pequeña punción o incisión en antebrazo del paciente y el cese de la hemorragia.¹⁹ El TH evalúa *in vivo* la función de las plaquetas y la integridad vascular. Dicha prueba se verá prolongada en padecimientos que afectan la función de las plaquetas, así como por la deficiencia cuantitativa o cualitativa del vWF.⁷

La prueba se realizó después de la extracción de sangre utilizando la técnica de Ivy por medio de un dispositivo estandarizado. En el laboratorio, el rango normal para esta prueba es de 4 a 8 min.¹⁵

La limitante de esta prueba es que a pesar de estar estandarizada los resultados pueden variar incluso en un mismo individuo. Además, no está necesariamente relacionada con la intensidad de la tendencia hemorrágica.²³

Este estudio no se realiza en pacientes que han utilizado antiplaquetarios en los últimos 10 días antes de realizar la prueba, así como en pacientes con cuenta plaquetaria menor a $100 \times 10^9/L$.⁷

7. Cuenta plaquetaria y volumen plaquetario medio.

La cuenta plaquetaria como el volumen plaquetario medio son importantes para poder clasificar cinco categorías de trastornos plaquetarios, recordando que la cuenta de plaquetas (PLT) tiene como rango normal de 150 a $450 \times 10^3/\mu\text{L}$ y el volumen plaquetario medio (VPM) de 7 a 12fL , siendo este directamente proporcional a la cuenta plaquetaria.

Para este estudio, la PLT y el VPM son importantes porque nos aportaran información relevante que facilite la diferenciación entre la EvW y algún otro trastorno hematológico. Además, con los resultados de estas pruebas, se orientó el diagnóstico en aquellos pacientes en los que se sospeche de una EvW tipo 2B.

- PLT disminuida y VPM alto: trombocitopenia autoinmune, síndrome de Bernard Soulier.
- PLT disminuida y VPM bajo: anemia megaloblástica, hiperesplenismo, tratamiento con quimioterapia, síndrome de Wiskott-Aldrich.
- PLT normal y VPM aumentado: talasemia, mielofibrosis.
- PLT alta y VPM normal: trombocitosis reactiva.
- PLT alta y VPM alto: leucemia mieloide crónica, esplenectomía.²⁴

Actualmente, el PLT y VPM se realizan de forma automatizada con un margen de error muy bajo (inferior al 2%).

Las plaquetas pueden contarse en la sangre total utilizando las mismas técnicas de detección eléctrica o electroóptica que se utilizan para contar los eritrocitos. Se necesita un umbral superior para separar a las plaquetas de los eritrocitos y un umbral inferior para separar las plaquetas de desechos y del ruido eléctrico. También, se puede medir por un

método nuevo utilizando citometría de flujo, donde las plaquetas de una muestra se marcan con un anticuerpo monoclonal específico (CD41, CD42 y CD61) o con una combinación de anticuerpos combinados con fluorocromos, y midiendo la proporción hematíes:plaquetas, se obtiene la cuenta plaquetaria.²⁵

8. Actividad del FVIII.

Se usó un método cromogénico para la determinación de la actividad del FVIII (BCSXP Siemens, kit Factor VIII Chromogenic Assay), ya que su sensibilidad es mayor que la del método coagulométrico. El FVIII presente en el plasma se activa por la adición de trombina. El FVIII activado acelera la conversión del factor X en FXa en presencia de factor IXa, fosfolípidos y Ca^{++} . El FXa actúa sobre un sustrato sintético conjugado con p-nitroanalina, esta última se hidroliza por efecto del FXa produciéndose color. La absorbancia se midió a 405 nm la cual es directamente proporcional a la actividad del FXa y, por ende, a la actividad plasmática del FVIII. Los valores de referencia utilizados para esta prueba oscilaban de 60 a 150 UI/dL.²⁶

9. Antígeno del factor de von Willebrand (VWF:Ag).

Esta prueba se utiliza para la determinación inmunoturbidimétrica o por ELISA del VWF:Ag. En este estudio se determinó cuantitativamente por inmunoturbidimetría (BCSXP Siemens, kit vWF Ag), esta prueba utiliza pequeñas partículas de poliestireno recubiertas de anticuerpos policlonales contra vWF. Los anticuerpos se unen a las partículas de poliestireno mediante uniones covalentes. Por lo tanto, el vWF del plasma aglutina a las partículas del reactivo, midiendo la aglutinación por turbidimetría, determinando el aumento

de la turbidez. La turbidez es directamente proporcional a la concentración del vWF. Los valores normales usados fueron de 60 a 160 UI/dL.²⁷

En respuesta a estímulos patológicos, tales como la inflamación, la concentración plasmática de vWF aumenta rápidamente.¹² El VWF:Ag es indetectable o casi indetectable (dependiendo de la sensibilidad del equipo) en los pacientes con EvW tipo 3, mientras que en los tipo 1 y 2 puede estar disminuida o normal.²³

10. Actividad de cofactor de ristocetina (VWF:RCo).

Este ensayo es esencial para el diagnóstico de la EvW, siendo útil para la detección de los tipos 2A, 2B y 2M, donde el VWF:Ag puede resultar normal o casi normal, mientras que el VWF:RCo esta disminuido.²⁸

En presencia del antibiótico ristocetina, el vWF se une al receptor GPIIb/IX/V de la plaqueta. Esto conduce a grados variables de aglutinación de plaquetas en función de la concentración del vWF. Por tanto, el VWF:RCo representa la actividad biológica del vWF.⁶

La aglutinación de las plaquetas disminuye la turbidez del plasma, y con ayuda de un analizador automatizado (BCS XP Siemens, kit BC von Willebrand Reagent) se midió la variación de la densidad óptica, la cual se tradujo en % de actividad del vWF y a su vez en UI/dL. Los valores normales utilizados oscilaban de 60 a 150 UI/dL.²⁹

11. Relación función/concentración del factor de von Willebrand.

Actualmente, esta relación representa una herramienta útil para el diagnóstico de EvW, ya que los resultados obtenidos permiten orientar el diagnóstico de laboratorio y así clasificar a la enfermedad.¹³

Tabla 1. Criterios de clasificación de EvW con base en las relaciones función/concentración del vWF (Favaloro, 2011).

Tipo de EvW	RCo/Ag	CB/Ag	FVIII/Ag
1	>0.7	>0.7	>0.7
2 ^a	<0.5-0.7	<0.5-0.7	>0.7
2B	<0.5-0.7	<0.5-0.7	>0.7
2N	>0.7	>0.7	<0.7
2M	<0.5-0.7	<0.5-0.7	>0.7
3	NA	NA	NA

NA : No Aplica; RCo/Ag: VWF:RCo/VWF:Ag; CB/Ag: VWF:CB/VWF:Ag; FVIII/Ag: FVIII/VWF:Ag.

Tabla 2. Criterios de clasificación de EvW utilizados en el estudio.

Tipo de EvW	RCo/Ag	FVIII/Ag
1	>0.6	>0.6
2A	<0.5-0.7	>0.6
2B	<0.5-0.7	>0.6
2N	>0.6	<0.6
2M	<0.5-0.7	>0.6
3	NA	NA

NA : No Aplica

12. Ensayo de RIPA.

Constituye una de las pruebas de función plaquetaria, a parte de la retracción del coágulo y TH. En esta prueba no se evalúa la agregación plaquetaria, ya que la glicoproteína implicada para que las plaquetas interactúen entre sí, es la GPIb y no la GPIIb. Es importante que el paciente suspendiera el uso de antiplaquetarios 10 días antes de la toma de muestra, así como acudir en ayuno con unos días antes de dieta baja en alimentos altos en grasas y no consumir bebidas alcohólicas.

La prueba se realizó en PRP del propio paciente y agregando diferentes concentraciones de ristocetina (0.25 a 1.25 mg/mL), observando la respuesta en cada una. La densidad óptica del PRP refleja el grado de aglutinación plaquetaria inducida por la ristocetina. La densidad óptica se observa usando un agregómetro (determinación por turbidimetría).³⁰ Se observa una agregación deficiente cuando existe un déficit del vWF para reaccionar con la GPIIb plaquetaria, dado que la ristocetina normalmente modifica la molécula del vWF para que interaccione con el receptor plaquetario GPIIb.²³

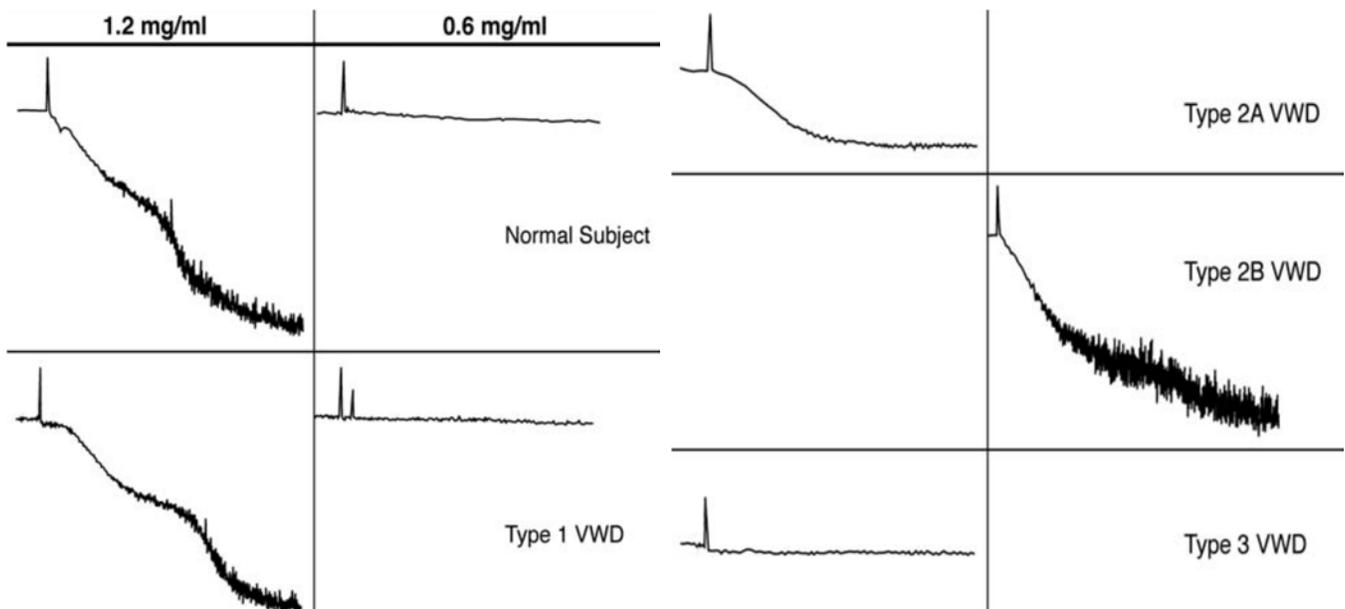


Fig 3. Gráficas de RIPA en diferentes condiciones.³

13. Análisis de los multímeros del factor de von Willebrand.

El análisis multimérico se basa en el uso de electroforesis en gel agarosa para la separación del vWF respecto a su peso molecular, bajo, intermedio y alto. Se preparó dos concentraciones diferentes de agarosa 0.6% y 1.2%, la primera para concentrar la muestra y la segunda para separación de los diferentes pesos moleculares del vWF. Las muestras se utilizaron a una concentración 1:10 las cuales se incubaron a 60°C/20 min, posteriormente se colocaron las muestras en los pozos del gel de agarosa para correr a 65V aproximadamente 10 h. Posteriormente, la visualización de los multímeros se obtuvo usando anticuerpos policlonales anti-vWF y anticuerpos conjugados para después realizar la reacción de revelado. Esta prueba se realizó siguiendo una técnica ya descrita, pero con ligeras modificaciones.³¹ **Ver anexo a.**

En el tipo 1, tipo 2M y tipo 2N todos los multímeros están presentes, mientras que en el tipo 2A y tipo 2B faltan los multímeros de alto y/o intermedio peso molecular y en el tipo 3 no se observan los multímeros.²³

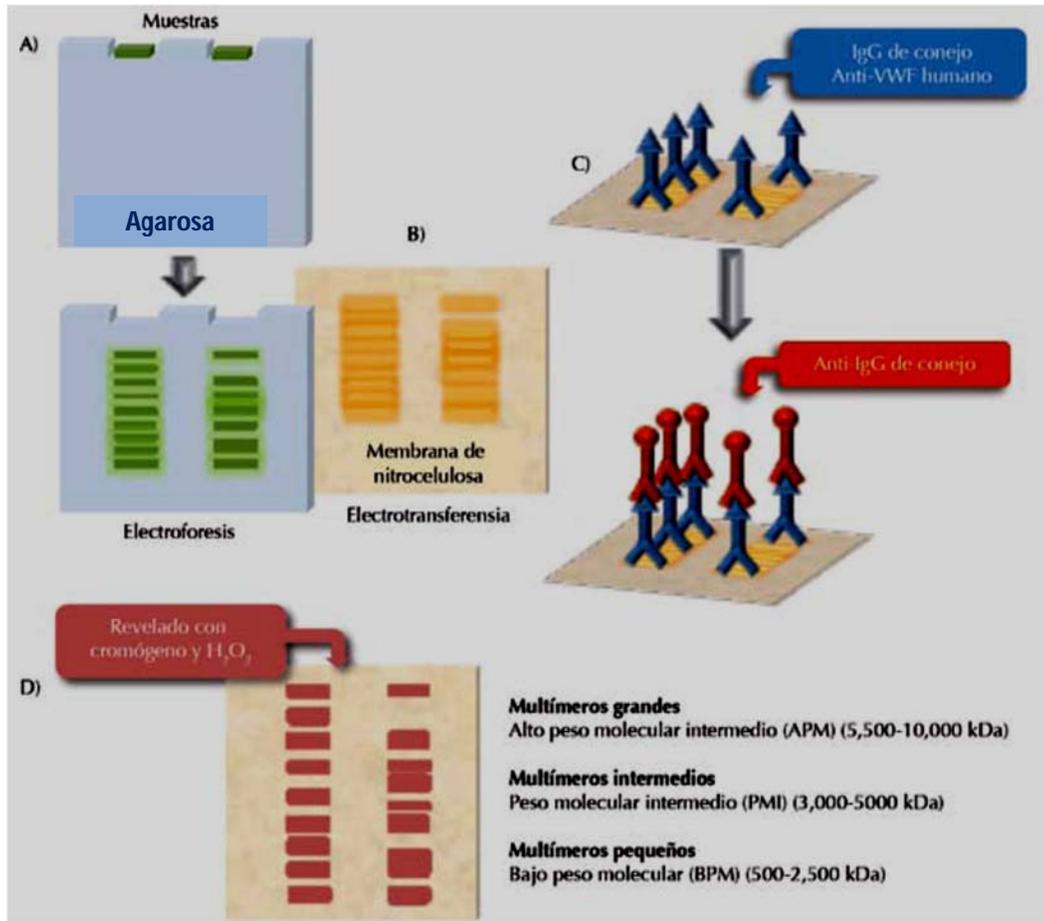


Fig 4. Análisis multimérico del vWF (modificado de Hernández y cols, 2014).³² A) Corrimiento electroforético en agarosa. B) Transferencia a membrana de nitrocelulosa. C) Incubación de la membrana con anticuerpo primario (anti-vWF) y secundario (anti IgG). D) Revelado con peróxido.

c. Análisis estadístico.

Se usó estadística descriptiva para el análisis de las características generales de los pacientes (promedio, media, mediana, valor máximo y valor mínimo). Se usó la prueba t de Student o U de Mann Whitney para realizar comparaciones entre los resultados de la pruebas. También se realizó análisis de correlación de Spearman. Se consideró un resultado significativo cuando $p \leq 0.05$.

VI. RESULTADOS.

Se analizaron las muestras de 116 pacientes mestizos mexicanos, 79 (68%) no se diagnosticaron con EvW; sin embargo, en 22 pacientes no se excluyó definitivamente el diagnóstico, ya que los síntomas clínicos y las pruebas de laboratorio sugirieron fuertemente la presencia de la EvW aunque no fue posible clasificar la enfermedad. Por otro lado, 27 pacientes (23%) presentaron EvW tipo 1, 1 paciente (0.8%) con EvW tipo 2A, 3 pacientes (2.4%) con EvW tipo 2B, 5 pacientes (4.0%) con EvW tipo 2M y 1 paciente (0.8%) con EvW tipo 3. La tabla 3 muestra la frecuencia de pacientes con EvW.

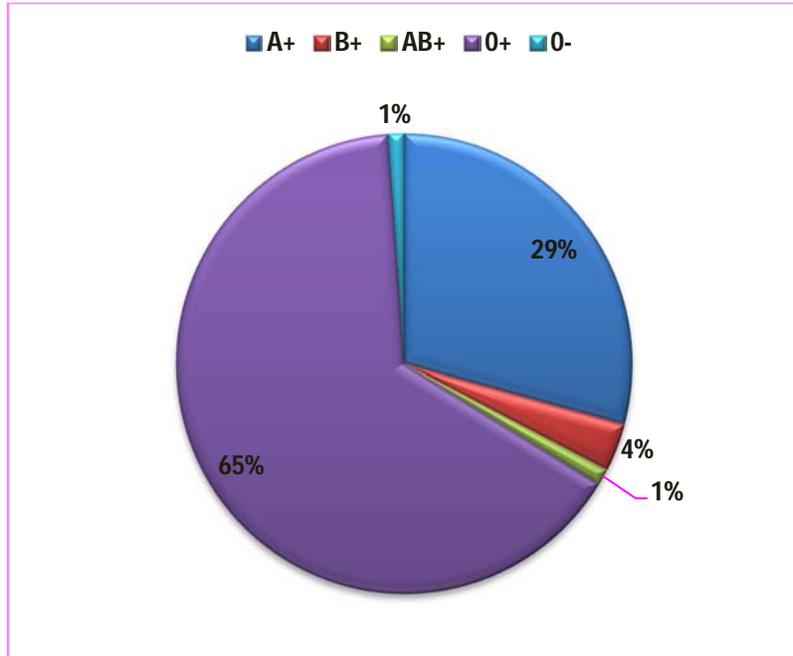
Tabla 3. Frecuencia de los subtipos de EvW en la población de estudio.

Grupos	Hombres n (%)	Mujeres n (%)
Total	28 (24%)	88 (76%)
Sin Dx	21 (18%)	58 (50%)
EvW tipo 1	6 (5%)	21 (18%)
EvW tipo 2A	1 (0.8%)	0 (0%)
EvW tipo 2B	3 (2.4%)	0 (0%)
EvW tipo 2M	5 (4.0%)	0 (0%)
EvW 3	1 (0.8%)	0 (0%)

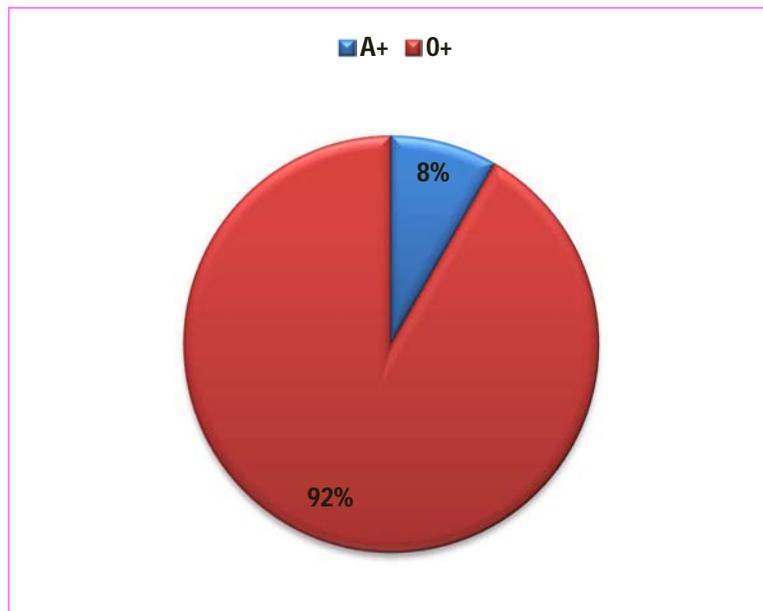
Sin Dx: Sin Diagnóstico

Resultados del grupo sanguíneo (GS) en los pacientes con sospecha clínica de EvW.

En la gráfica 1 se observa la frecuencia de los GS de la totalidad de los pacientes incluidos (n=116). La gráfica 2 muestra la frecuencia de los GS en los pacientes con EvW (n=37).



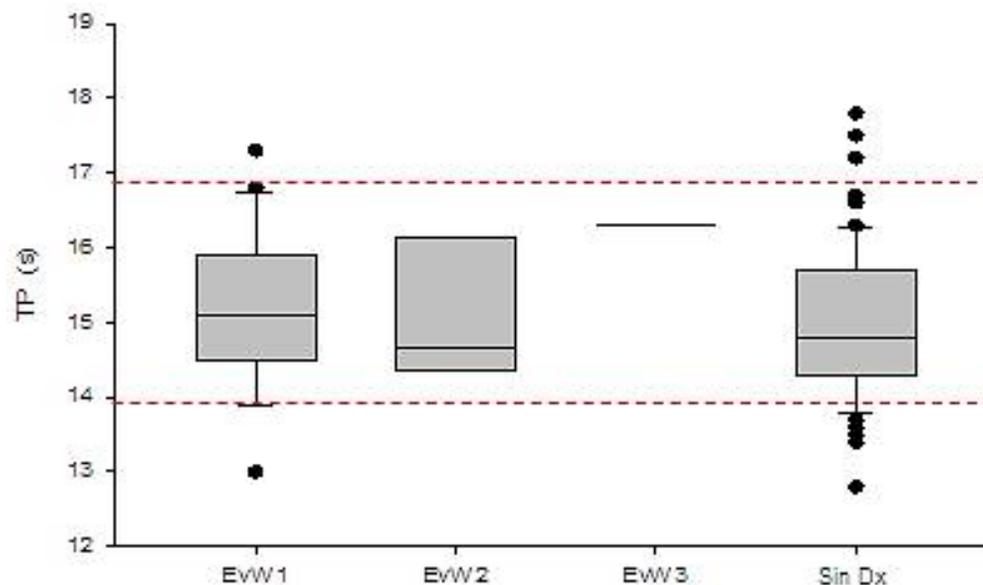
Gráfica 1. Frecuencia de los GS en los pacientes con sospecha de EvW (n=116). Sesenta y cinco por ciento de los pacientes fueron portadores del GS O+, veintinueve por ciento del GS A+, cuatro por ciento del GS B+ y un uno por ciento de los GS AB+ y O-. El GS O+ fue el más frecuente entre los pacientes seguido del GS A+.



Gráfica 2. Frecuencia de los GS en pacientes con EvW. El GS O+ se encontró en 92% de los pacientes con EvW, mientras que el 8% restante correspondió a los pacientes con el GS A+. Los pacientes con GS A+ se diagnosticaron con EvW tipo 1.

Resultados del TP en los pacientes con sospecha clínica de EvW.

El 98.4% de los pacientes con sospecha de EvW (n=110) presentaron TP normales con respecto al plasma testigo, tan sólo 6 pacientes (1.6%) presentaron prolongación del TP, 4 de ellos no fueron diagnosticados con EvW y los otros 2 si fueron portadores de la EvW (1 con EvW tipo 1 y 1 con EvW tipo 2A). La gráfica 3 muestra la distribución de los resultados del TP en los pacientes con sospecha clínica de EvW.

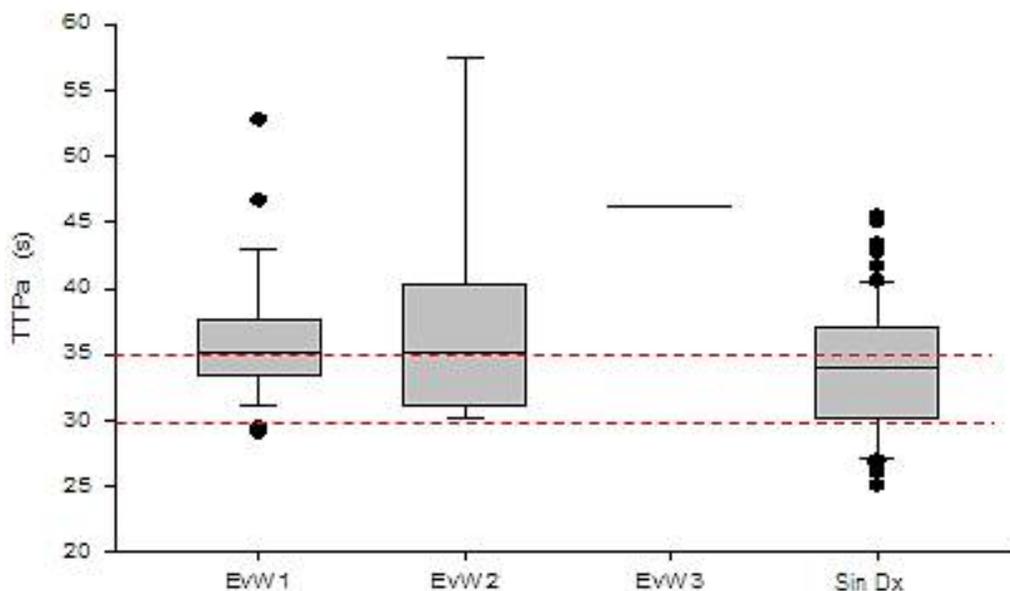


Gráfica 3. Resultados del TP en pacientes con sospecha clínica de EvW. La línea inferior corresponde al valor del TP del plasma testigo (13.9 s) y la superior al valor normal máximo de TP (16.9 s). En los pacientes con EvW, los rangos para el TP oscilaron de 13.0 a 17.3 s y con una mediana de 15.1 s en la EvW tipo 1, para EvW tipo 2 el rango fue de 13.8 a 18.1 s con una mediana de 14.7 s y para los pacientes sin diagnóstico su TP oscilo de 12.8 a 17.8 s con una mediana de 14.8 s.

Al comprar los resultados del TP entre los pacientes con EvW y los pacientes sin diagnóstico de esta enfermedad no encontramos diferencia significativa ($p>0.05$).

Resultados del TTPa en los pacientes con sospecha clínica de EvW.

De los 116 pacientes estudiados, el 51% presentó resultados normales del TTPa y 49% resultados prolongados. En los pacientes con EvW, los rangos de TTPa encontrados para los diferentes subtipos de la enfermedad fueron los siguientes: 29.1 a 52.8 s en la EvW tipo 1, 30.3 a 57.4 s en la EvW tipo 2 y 46.2 s para el único paciente diagnosticado con EvW tipo 3. Mientras los pacientes sin diagnóstico su rango de TTPa osciló de 25.1 a 45.5 s. La gráfica 4 muestra la distribución de los resultados del TTPa en los pacientes con sospecha clínica de EvW.



Gráfica 4. Resultados del TTPa en pacientes con sospecha clínica de EvW. La línea inferior corresponde al valor del TTPa del plasma testigo (29.6 s) y la superior al valor normal máximo de TTPa (34.6 s). En los pacientes con EvW tipo 1 la mediana del TTPa fue 35.2 s, 35.2 s en pacientes con EvW tipo 2, 46.2 s para pacientes con EvW tipo 3 y 33.9 s para los pacientes sin diagnóstico.

No se encontró diferencia significativa al comparar los resultados del TTPa entre los pacientes con EvW y los pacientes sin diagnóstico de esta enfermedad ($p > 0.050$).

Sorprendentemente, el 38% de los pacientes con EvW tuvieron resultados normales del TTPa (EvW tipo 1, n=10 pacientes; EvW tipo 2M, n=2), por lo tanto, solo en el 62% de los pacientes con EvW el TTPa fue prolongado (≥ 5 s respecto al plasma testigo).

Resultados de la concentración plasmática de fibrinógeno en los pacientes con sospecha clínica de EvW.

La concentración plasmática del fibrinógeno varió considerablemente entre los pacientes incluidos (120 a 670 mg/dL). En los pacientes con EvW, la concentración plasmática del fibrinógeno se mantuvo dentro de valores de referencia (Tabla 4). Sin embargo, no observamos diferencia significativa entre los pacientes con EvW y los pacientes sin diagnóstico de la enfermedad ($p > 0.05$).

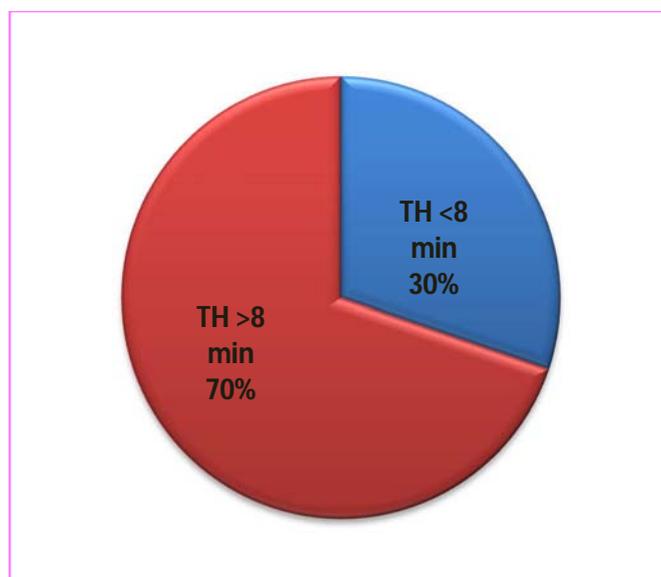
Tabla 4. Resultados de la concentración plasmática del fibrinógeno en los pacientes con sospecha clínica de EvW.

Grupos	Media (mg/dL)	Rango (mg/dL)
Sin Dx (n=79)	301.9	120 – 670
EvW tipo 1 (n=27)	273.2	190 – 370
EvW tipo 2A (n=1)	300.0	NA
EvW tipo 2B (n=3)	333.3	320 – 350
EvW tipo 2M (n=5)	272.0	240 – 320
EvW tipo 3 (n=1)	330.0	NA

NA: No Aplica.

Resultados del TH en los pacientes con sospecha clínica de EvW.

Se usó la técnica de Ivy, con valores de referencia de 4 a 8 min. Para la totalidad de los pacientes (n= 116) el TH medio fue 10.6 min (Rango = 3 a 100 min). La gráfica 5 muestra el porcentaje de pacientes con sospecha clínica de EvW con TH normal y prolongado. La tabla 5 muestra los resultados del TH observados en los diferentes grupos de pacientes.



Gráfica 5. Porcentaje de pacientes con sospecha clínica de EvW (n=116) con resultados normales y prolongados del TH. Los resultados normales del TH se muestran en color azul, y en rojo los resultados prolongados.

Tabla 5. Resultados del TH en los pacientes con sospecha clínica de EvW.

Grupos	Media (min)	Rango (min)
Sin Dx (n=79)	10.7	4.5 – 100
EvW tipo 1 (n=27)	10.4	3 – 19.5
EvW tipo 2A (n=1)	18	NA
EvW tipo 2B (n=3)	12.0	NA
EvW tipo 2M (n=5)	12.6	5.5 – 18
EvW tipo 3 (n=1)	12.0	NA

NA: No Aplica.

Siete pacientes (24%) con EvW tuvieron TH normales (< 8 min; EvW tipo 1, n= 6; EvW tipo 2M, n=1). No existió correlación estadística entre los resultados del TH y VWF:Ag (p>0.05).

Resultados de la cuenta plaquetaria y VPM en los pacientes con sospecha clínica de EvW.

Los resultados de estas pruebas se muestran en la tabla 6. Interesantemente, 1 paciente con EvW 2B presentó una PLT de 2×10^3 plaquetas/ μ L. Mientras que el VPM se encontró ligeramente bajo en un 40.5 % de los pacientes, pero los valores de la PLT no dieron razón para sospechar de alguna alteración plaquetaria.

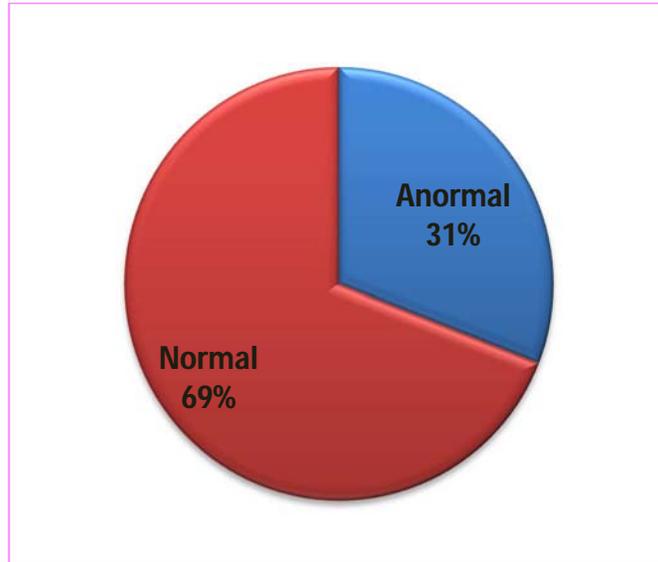
Tabla 6. Resultados de la PLT y VPM en los pacientes con sospecha clínica de EvW.

Grupos	PLT Media ($10^3/\mu$ L)	PLT Rango ($10^3/\mu$ L)	VPM Media (fL)	VPM Rango (fL)
Sin Dx (n=79)	260	39 – 568	7.2	4.2 – 16
EvW tipo 1 (n=27)	242	220 – 305	7.4	6.1 – 7.9
EvW tipo 2A (n=9)	332	115 – 346	7.0	4.7 – 10.6
EvW 3 (n=1)	300	NA	5.4	NA

NA: No Aplica.

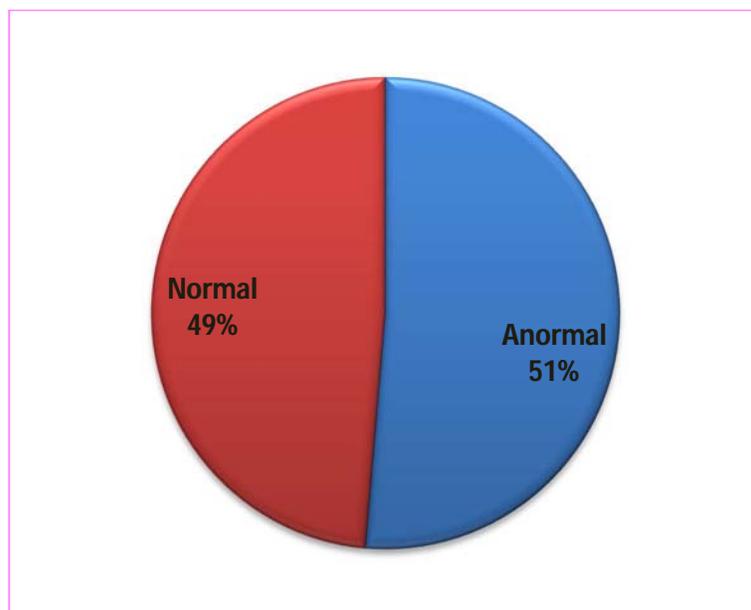
Resultados de la actividad del FVIII en los pacientes con sospecha clínica de EvW.

La actividad media del FVIII en los pacientes con sospecha de EvW (n=116) fue de 76.4UI/dL (Rango = 6 a 117 UI/dL). La gráfica 6 muestra el porcentaje de pacientes con resultados normales y anormales de la actividad del FVIII.

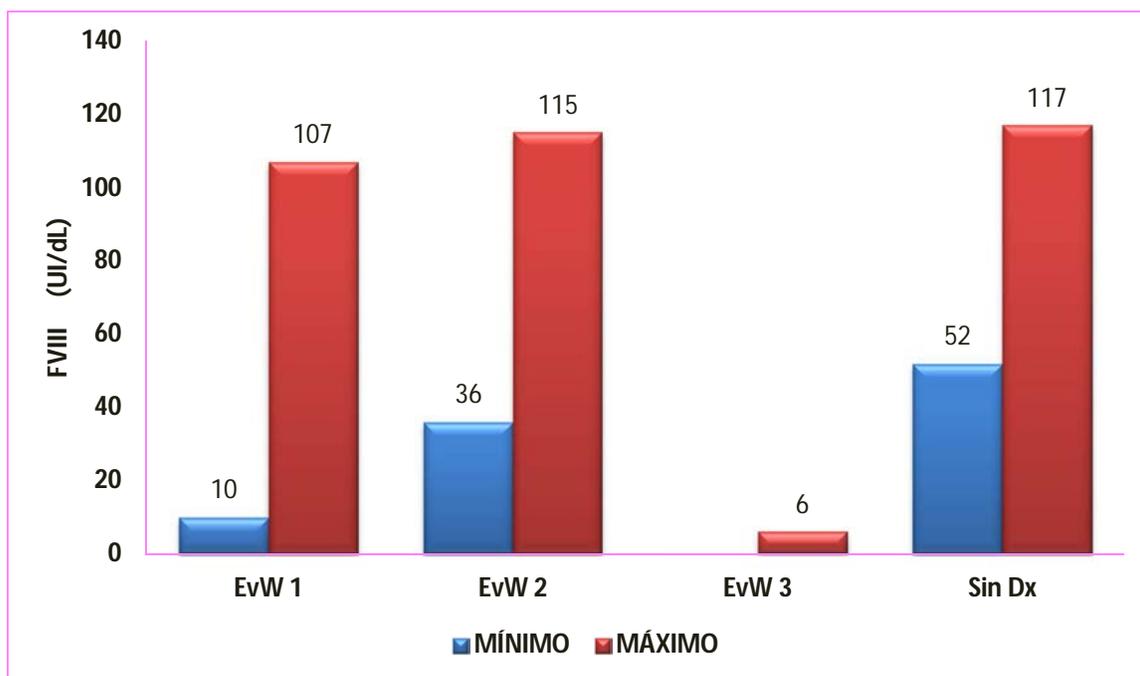


Gráfica 6. Porcentaje de pacientes con resultados normales (> 60 UI/dL) y anormales (< 60 UI/dL) de la actividad del FVIII (n=116).

Para los pacientes con EvW, la actividad media del FVIII fue la siguiente: 54.3 UI/dL en la EvW tipo 1, 105 UI/dL en EvW tipo 2A, 54 UI/dL en EvW tipo 2B y 54.4 UI/dL en EvW tipo 2M. Para el paciente con EvW tipo 3 la actividad del FVIII fue de 6 UI/dL. La gráfica 7 muestra el porcentaje de pacientes con diagnóstico de EvW con resultados normales y anormales de la actividad del FVIII, mientras que la gráfica 8 muestra los valores mínimos y máximos de la actividad del FVIII tanto en los pacientes con EvW, como en los pacientes sin diagnóstico de esta enfermedad. No encontramos diferencias significativas al comparar los resultados de la actividad del FVIII entre los pacientes con EvW y los pacientes sin esta enfermedad ($p>0.05$).



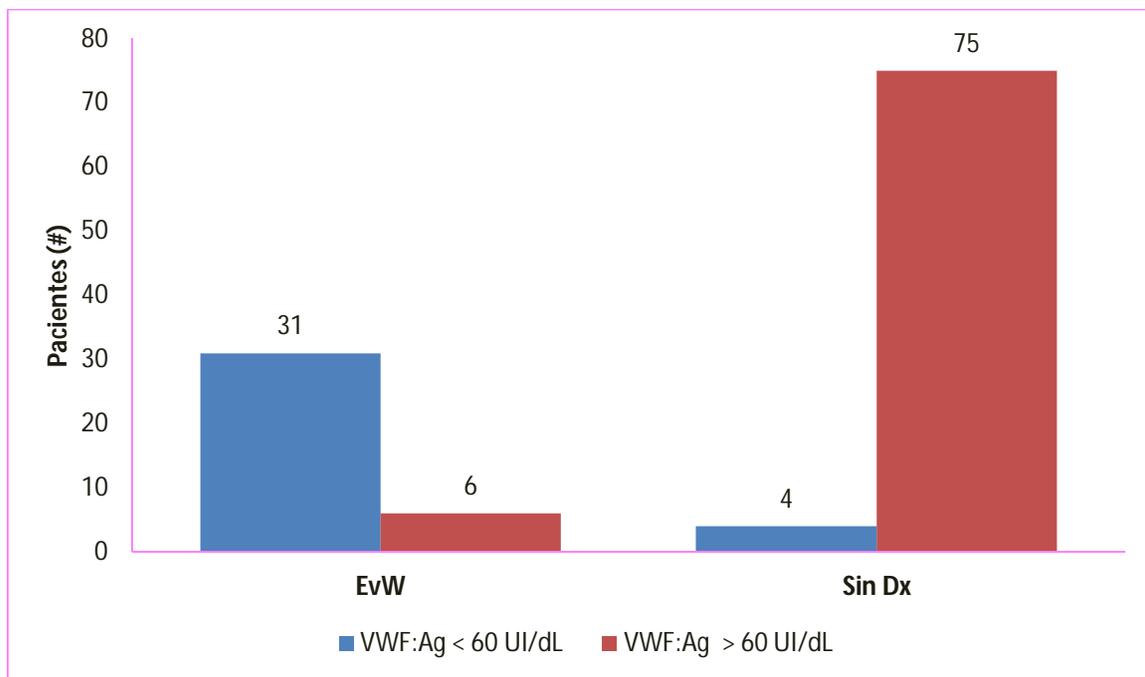
Gráfica 7. Porcentaje de pacientes con EvW (n=37) con resultados normales (> 60 UI/dL) y anormales o bajos (< 60 UI/dL) de la actividad del FVIII.



Gráfica 8. Valores mínimos y máximos de la actividad del FVIII en los pacientes con sospecha clínica de EvW. Para el paciente con EvW tipo 3, la actividad del FVIII corresponde al valor máximo.

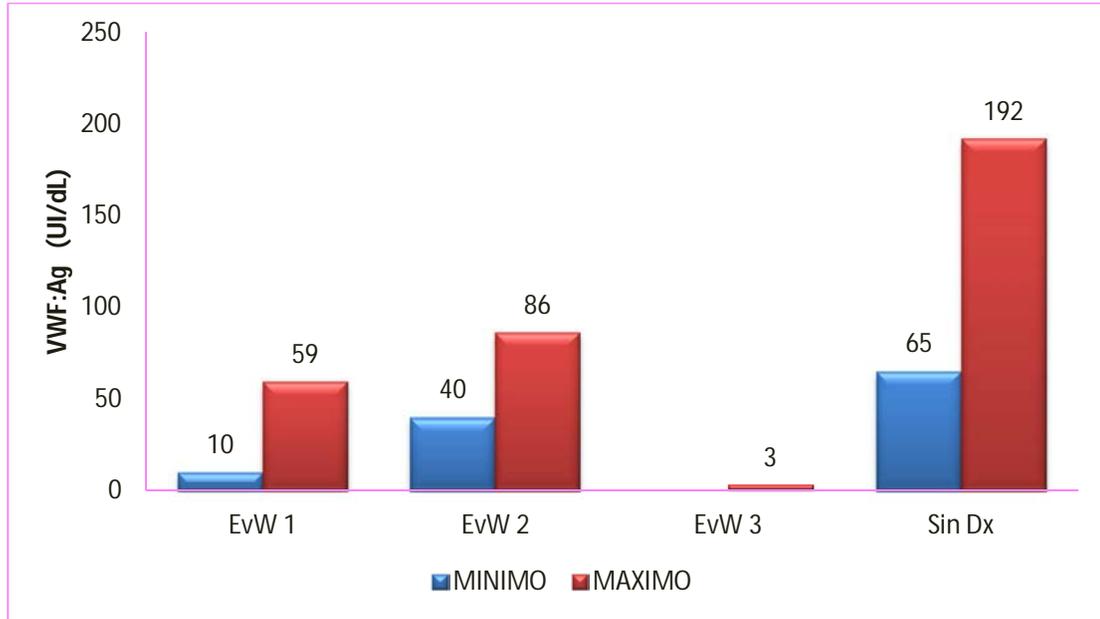
Resultados del VWF:Ag en los pacientes con sospecha clínica de EvW.

En los pacientes con sospecha de EvW (n=116), el VWF:Ag osciló de 3 a 192 UI/dL, con una media de 79.9 UI/dL. La gráfica 9 muestra el porcentaje de resultados normales y bajos del VWF:Ag.



Gráfica 9. Pacientes con sospecha clínica de EvW (n=116) con resultados bajos (azul) y normales (rojo) del VWF:Ag.

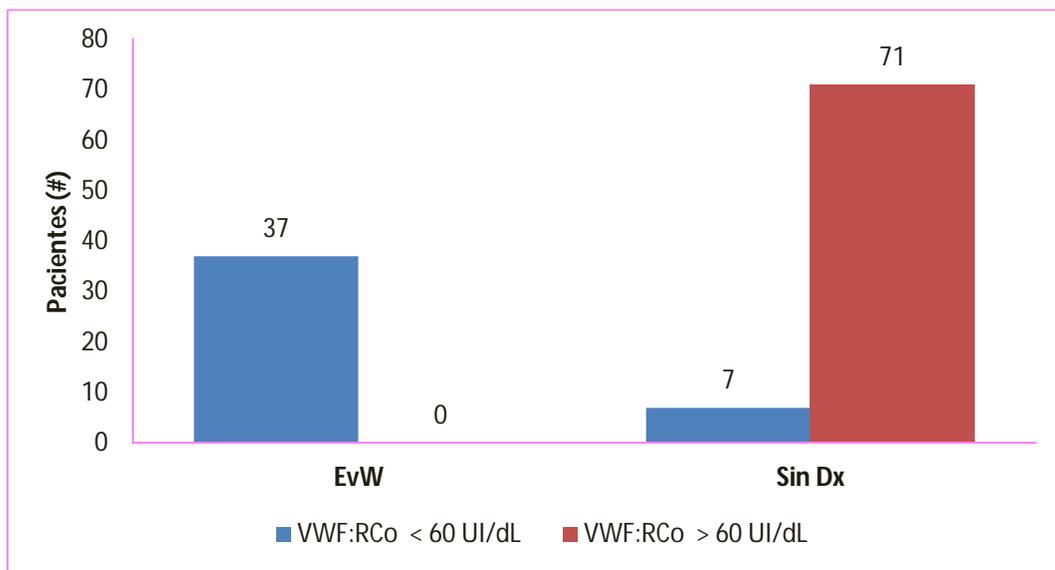
En los pacientes con EvW tipo 1, la media del VWF:Ag fue de 43.8 UI/dL (Rango = 10 a 59 UI/dL). Mientras que en los pacientes con EvW tipo 2, la media del VWF:Ag fue 72.6 UI/dL (Rango = 58 a 86 UI/dL). En el paciente con EvW tipo 3, el VWF:Ag fue 3 UI/dL. La gráfica 10 muestra los valores mínimos y máximos del VWF:Ag en los pacientes con EvW y sin diagnóstico de esta enfermedad.



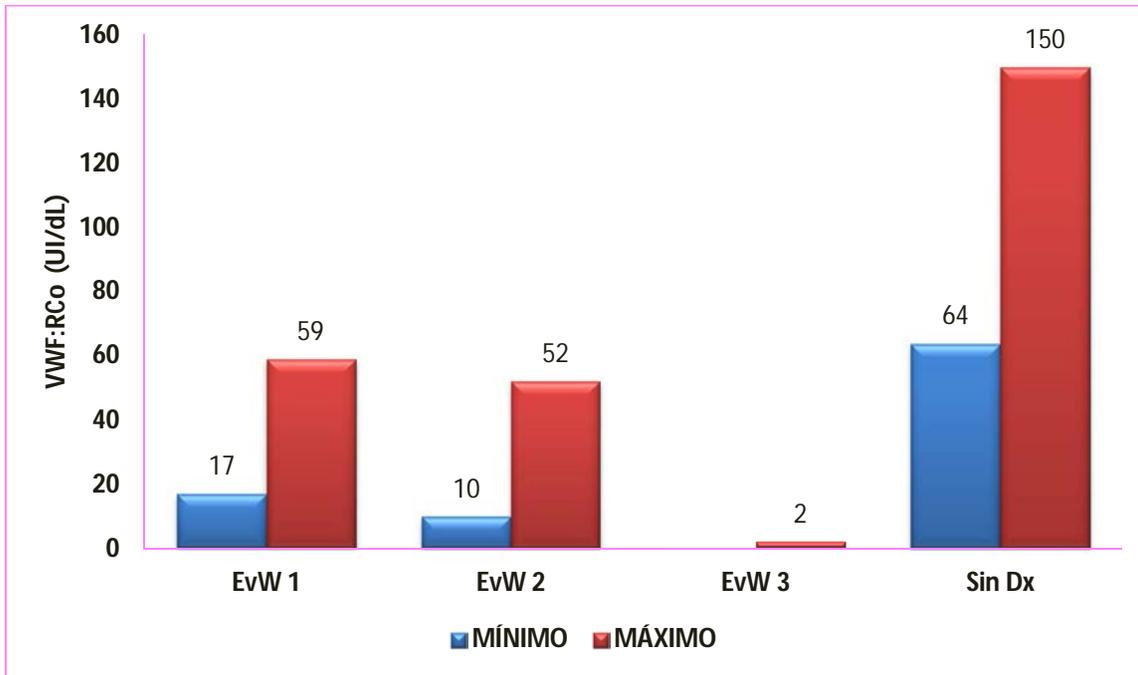
Gráfica 10. Valores mínimos y máximos del VWF:Ag en los pacientes con sospecha clínica de EvW. Para el paciente con EvW 3, el VWF:Ag corresponde al valor máximo.

Resultados del VWF:RCo en los pacientes con sospecha clínica de EvW.

Los resultados de esta prueba se resumen en las gráficas 11 y 12.



Gráfica 11. Pacientes con sospecha clínica de EvW (n=116) con resultados normales (rojo) y bajos (azul) del VWF:RCo.



Gráfica 12. Valores mínimos y máximos del VWF:RCo en los pacientes con sospecha clínica de EvW. Para el paciente con EvW tipo 3, el VWF:RCo corresponde al valor máximo.

Resultados de la prueba de RIPA en los pacientes con EvW tipo 2B.

Esta prueba fue de utilidad sólo para el diagnóstico de la EvW tipo 2B. La figura 5 muestra los resultados de la prueba de RIPA de 1 de los 3 pacientes con EvW tipo 2B. En 2 pacientes fue imposible realizar la prueba debido a la magnitud de la pseudotrombocitopenia observada en ambos casos ($< 50 \times 10^3$ plaquetas/ μ L en el PRP). En estos 2 casos, el diagnóstico de la EvW se hizo considerando los resultados del análisis multimérico del vWF (ausencia de los multímeros de peso molecular alto) y de la relación VWF:RCo/VWF:Ag.

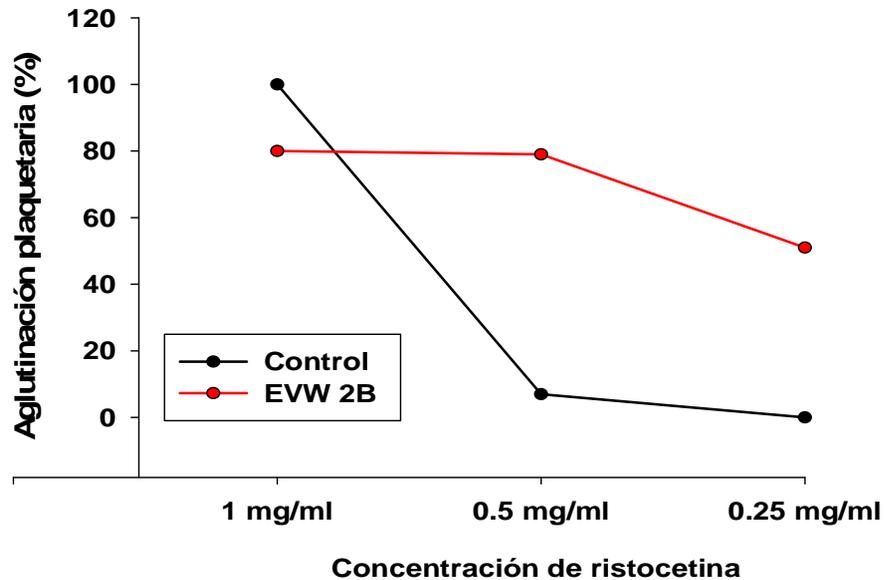


Figura 5. Resultados de la prueba de RIPA en 1 paciente con EvW tipo 2B y su respectivo control. Para el paciente con EvW los resultados de la RIPA fueron 79, 78 y 58 % correspondientes a las concentraciones de ristocetina de 1, 0.5 y 0.25 mg/mL, respectivamente. Por su parte, los resultados de la RIPA del plasma control fueron 100, 5 y 2% a las diferentes concentraciones de ristocetina.

Resultados del análisis multimérico del vWF en los pacientes con EvW.

Esta prueba se basa en un western blot el cual muestra la presencia de los multímeros del vWF en bandas de diferentes pesos moleculares. Aproximadamente, las primeras 4 bandas corresponden a los pesos moleculares bajos, la siguientes 6 bandas a los pesos moleculares intermedios y a partir de este punto, se observan los pesos moleculares altos del vWF. La siguiente imagen muestra los resultados del análisis multimérico del vWF.

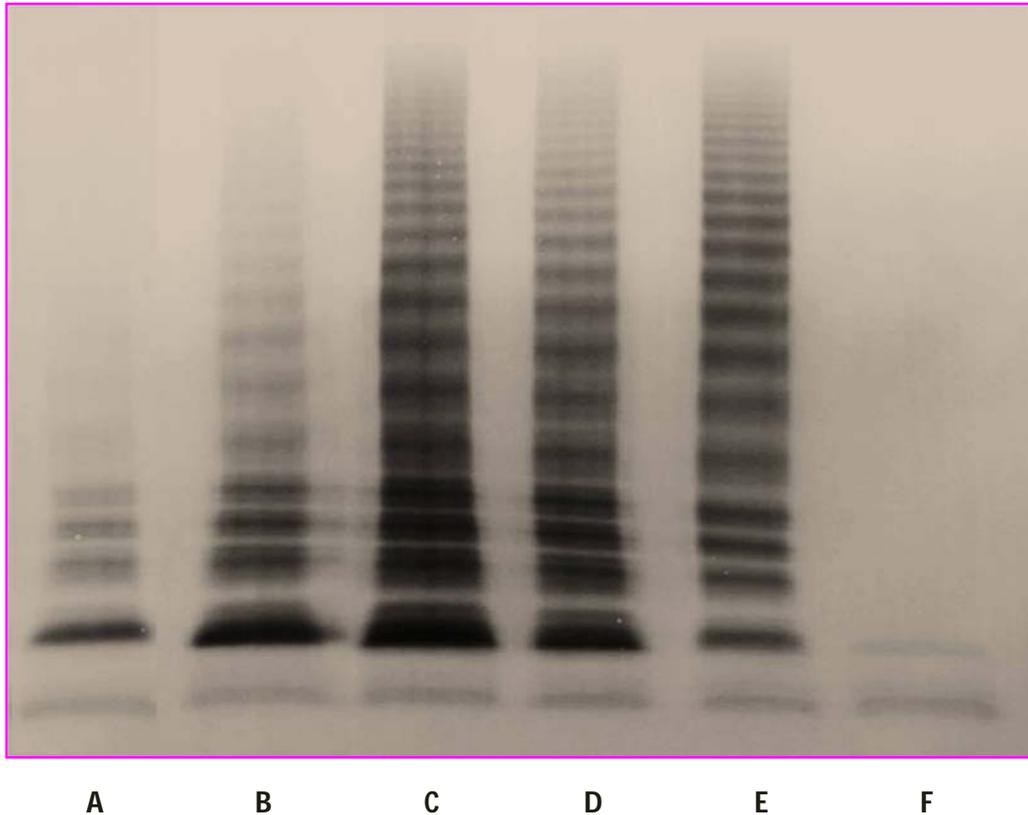


Figura 6. Gel de agarosa 1.5%, SDS 0.1 % transferido a nitrocelulosa. Cada carril corresponde a un tipo de EvW. Las primera 4 bandas representan los multímeros de bajo peso molecular del vWF, las siguientes 6 bandas a los multímeros de peso molecular intermedio y las bandas siguientes a los pesos moleculares altos de la proteína. A: paciente con EvW tipo 2A; B: paciente con EvW tipo 2B; C: control; D: paciente con EvW tipo 1; E: paciente con probable EvW tipo 2M o 2N y F: paciente con EvW tipo 3.

Resultados de las relaciones RCo/Ag y FVIII/Ag en los pacientes con EvW.

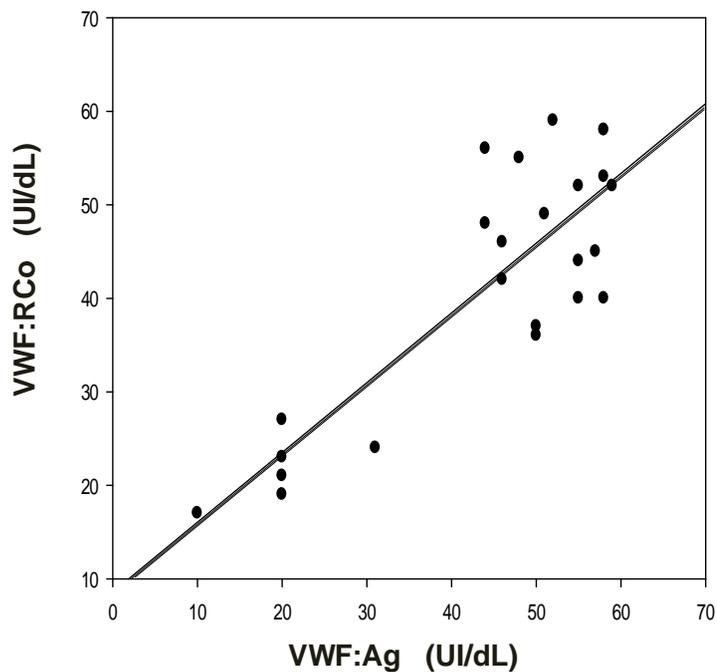
Los resultados se muestran en la tabla 8. Se consideró como valor de cohorte 0.6, sin embargo, en la literatura los valores inferiores de 0.7 suelen tomarse como sugestivos de alteraciones cualitativas del vWF.

Tabla 7. Resultados de las relaciones RCo/Ag y FVIII/Ag en los pacientes con EvW.

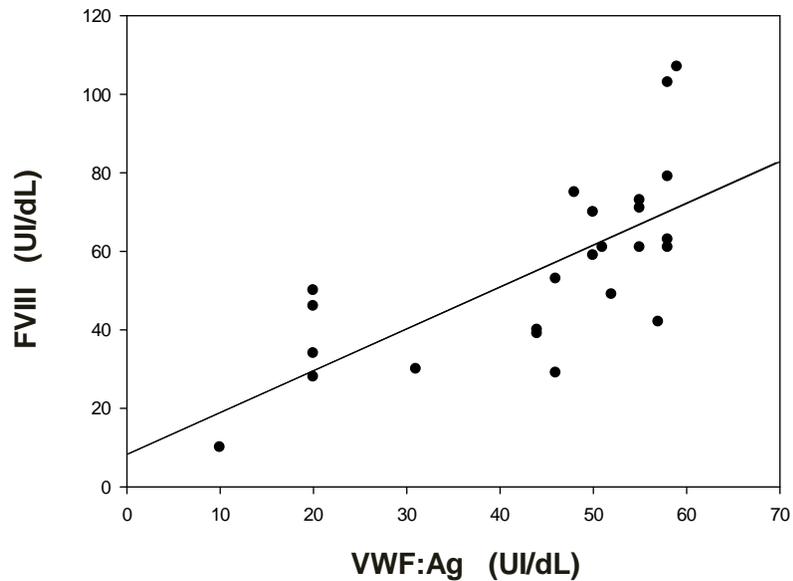
Tipos EvW	RCo/Ag	FVIII/Ag
1	0.97	1.28
2A	0.61	1.30
2B	0.39	0.93
2M	0.58	1.03
3	NA	NA

Los resultados corresponden a la media, excepto en los tipos 2A y 3.

Las gráficas 13 y 14 muestran la correlación estadística entre los resultados de las pruebas VWF:Ag y VWF:RCo y FVIII en los pacientes con EvW tipo 1.



Gráfica 13. Correlación de las pruebas VWF:Ag y VWF:RCo en pacientes con EvW tipo 1 ($p < 0.05$).



Gráfica 14. Correlación de las pruebas VWF:Ag y FVIII en pacientes con EvW tipo 1 ($p < 0.05$).

VII. DISCUSIÓN.

Para discutir nuestros resultados, es necesario retomar algunos conceptos fundamentales que fueron expuestos a lo largo del escrito. En primer lugar, la EvW es la enfermedad hemorrágica más frecuente en el mundo, con una prevalencia de 1% en la población general³³, aunque sólo el 0.1% de los pacientes presentan sintomatología hemorrágica importante.³⁴ En México, durante muchos años se pensó que la prevalencia de esta enfermedad era casi imperceptible debido a sus características genéticas. A pesar de esto, la evidencia clínica y de laboratorio sugería que entre los mexicanos estaba presente una patología hemofílica que hacía sospechar de EvW. No obstante, la mayor parte de los pacientes no se diagnosticaban o el diagnóstico era equivocado. En segundo lugar, es

importante mencionar que en la actualidad el diagnóstico de laboratorio de la EvW varía enormemente entre los países desarrollados y no desarrollados como México. Está demostrado que en países de América Latina el porcentaje de errores en el diagnóstico de EvW es muy superior al observado en países de primer mundo.² Desafortunadamente, para los expertos en el tema, México no forma parte de los países del continente Americano con experiencia diagnóstica en EvW.

El vWF es una glicoproteína compleja que reconoce distintos ligandos, lo que hace de su estudio un reto para los laboratorios clínicos. A diferencia de la hemofilia A o B en la cual el conocimiento de los niveles plasmáticos del FVIII o FIX permite diagnosticar y clasificar a la enfermedad, en la EvW se requiere de muchas pruebas fenotípicas y en ocasiones genéticas para establecer el diagnóstico de la enfermedad³⁵ y clasificarla en sus diferentes tipos: 1, 2A, 2B, 2M, 2N y 3.³⁶ El diagnóstico de la EvW inicia con la historia personal o familiar de hemorragia para después completarlo con pruebas de laboratorio que evalúan la concentración y función del vWF.³⁷ El diagnóstico fenotípico de la EvW es tan complejo que en ocasiones los resultados obtenidos de un mismo paciente varían día tras día, en un mismo laboratorio o entre diferentes laboratorios. La falta de experiencia en el diagnóstico de la EvW es una de las causas de variación en los resultados de las pruebas fenotípicas.² El análisis genético se utiliza cuando no es posible establecer el diagnóstico de EvW con las pruebas convencionales; sin embargo, su utilidad está limitada debido a que los niveles plasmáticos del vWF no sólo dependen del gen de esta proteína, sino de otros genes y proteínas involucradas en la biología de este factor hemostático y de múltiples factores ambientales.³⁸

La selección de los pacientes estuvo a cargo de médicos hematólogos especialistas en enfermedades hemorrágicas. De esta manera, la historia personal o familiar de hemorragia fue el criterio primordial para elegir a los pacientes.

La primera prueba realizada fue la determinación del GS, el cual influye parcialmente en los niveles plasmáticos del vWF, sin embargo, no es una prueba diagnóstica. Los pacientes con GS 0 tienen niveles plasmáticos del vWF inferiores a los pacientes con otros GS.³⁹ Independientemente de lo anterior, el peso del GS sobre los resultados del VWF:Ag no fue trascendental en el estudio debido a que se establecieron valores de referencia en población mexicana con GS 0. La importancia del GS radica en que hace algunos años se pensaba que la EvW era propia de poblaciones caucásicas. La población mexicana está compuesta fundamentalmente por individuos mestizos en los que la mayor contribución genética proviene de las poblaciones indígenas y española.⁴⁰ Entre las características que definen a un individuo como indígena, se encuentra el GS 0,^{40,41} en México más del 80% de las personas son portadores de este GS, lo que hace evidente el impacto de la herencia indígena entre los mexicanos.

Interesantemente, el 92% de los pacientes con EvW presentaron GS 0+ y sólo 8% GS A+. Estos datos sugieren fuertemente, que la presencia de la EvW en la población mexicana no se debe al efecto del mestizaje como resultado de las grandes migraciones poblacionales de Europa hacia el continente Americano, sino que las alteraciones del vWF son propias de

nuestra herencia indígena. Por su puesto, esta es sólo una hipótesis derivada de nuestro estudio.

Pasando a otro tema, para diagnosticar a los pacientes con sospecha clínica de EvW hicimos uso de pruebas de laboratorio que a nuestro criterio clasificamos como de escrutinio y especiales. Las pruebas de escrutinio comprendieron al TP, TTPa, TH y fibrinógeno. Los resultados del TP y fibrinógeno fueron los esperados; es decir, ninguno de los pacientes con EvW presento alteraciones importantes en estas pruebas. A pesar de estos resultados, la determinación del TP no debe excluirse del diagnóstico de EvW ya que los resultados normales de esta prueba en conjunto con el TTPa prolongado orientan el diagnóstico de laboratorio hacia algún defecto de la vía intrínseca de la fase plasmática de la hemostasia, como puede ser la EvW. En cambio, la determinación del fibrinógeno no es esencial para el escrutinio de EvW.

El TH fue anormal (≥ 8 min) en 52% de los pacientes con EvW tipo 1. Mientras que en la EvW tipo 2 y 3, todos los pacientes tuvieron resultados prolongados de esta prueba. Estos resultados sugieren que la sensibilidad del TH en la EvW tipo 1 es baja. Si a lo anterior le sumamos que el TH no es una prueba específica para diagnosticar alteraciones del vWF, quizá sea conveniente sugerir que el TH no se incluya dentro de las pruebas diagnósticas de escrutinio.

En cuanto al TTPa, 62% de los pacientes con EvW tuvieron resultados prolongados de esta prueba (≥ 5 s vs. plasma testigo), principalmente los pacientes con el tipo 1. Para

incrementar la sensibilidad de la prueba, el TTPa se consideró prolongado cuando la diferencia en segundos con respecto al plasma testigo fue ≥ 4 s. Se realizaron correcciones y diluciones de los plasmas de los pacientes con TTPa prolongados para determinar si los resultados alterados se debían a la deficiencia de alguno de los factores de la vía intrínseca o a la presencia de un inhibidor. Con estas estrategias, el número de pacientes con TTPa prolongados incremento de 62 a 71%. Debido a que en la EvW los resultados del TTPa pueden ser normales, esta prueba no debe usarse para excluir a la enfermedad.

Las pruebas especiales comprendieron la determinación del VWF:Ag, VWF:RCo, RIPA y el análisis multimérico del vWF. Las relaciones función-concentración (VWF:RCo/VWF:Ag y FVIII/VWF:Ag) orientaron el diagnóstico hacia un defecto cuantitativo (EvW tipo 1 y 3) o cualitativo (EvW tipo 2) del vWF. Brevemente, en los pacientes con EvW tipo 1 (n=27) las relaciones VWF:RCo/VWF:Ag y FVIII/VWF:Ag fueron ≥ 0.7 , lo que evidenció la deficiencia cuantitativa del vWF. Por su parte, el paciente con EvW tipo 3, mostró niveles francamente disminuidos del vWF (2 UI/dL) los cuales establecieron el diagnóstico de la enfermedad. El paciente con EvW tipo 2A, mostro resultados anormales en el análisis multimérico del vWF (ausencia de los multímeros de intermedio y alto peso molecular). Además, el resultado de la relación VWF:RCo/VWF:Ag (< 0.6) fue compatible con alteraciones en la función del vWF. Por el contrario, en los pacientes con EvW tipo 2B (n=4), la alteración del dominio A1 del vWF originó trombocitopenia y eliminación de los multímeros de peso molecular alto de la proteína, ocasionando secundariamente, resultados anormales para el VWF:RCo y la relación VWF:RCo/VWF:Ag. En 1 paciente con EvW tipo 2B, la prueba de RIPA se mantuvo

normal al usar concentraciones decrecientes de ristocetina (1.2 a 0.25 mg/mL), lo que hizo evidente la afinidad incrementada del vWF por las plaquetas.

Los pacientes con EvW tipo 2M (n=5) se caracterizaron por presentar resultados anormales de la relación VWF:RCo/VWF:Ag (< 0.6), y resultados normales en el análisis multimérico del vWF.

La EvW tipo 1 fue la más frecuente de los subtipos de la enfermedad (n=27); sin embargo, cuando los criterios diagnósticos se ajustaron a las recomendaciones internacionales, la cifra de pacientes disminuyó considerablemente. De manera general, se considera EvW tipo 1 cuando los niveles plasmáticos del VWF:Ag y VWF:RCo (o VWF:CB) oscilan entre 30 y 40 UI/dL; mientras que por arriba de estos valores, pero < 50 UI/dL se considera deficiencia del vWF.^{37,42} Por lo tanto, aplicando estos criterios a los 27 pacientes con EvW tipo 1, se reducen a sólo 10 pacientes con la enfermedad. A pesar de estos resultados, el diagnóstico de EvW tipo 1 se mantuvo en todos los pacientes considerando que el criterio diagnóstico más importante en EvW es la sintomatología clínica, y en para los casos, la historia hemorragia fue el principal criterio de selección de los pacientes.

Setenta y nueve pacientes no tuvieron diagnóstico de EvW. En 22 pacientes, el diagnóstico de EvW no se estableció porque los resultados de las pruebas de laboratorio estuvieron en el límite normal de referencia. En 12 pacientes, se tuvo la sospecha de EvW tipo 1 (n=5), para el tipo 2M (n=5) y para el tipo 2N (n=2). Los 10 pacientes restantes tuvieron resultados alterados al azar en alguna de las pruebas especiales para diagnóstico de EvW. Por otro lado, 18 pacientes se diagnosticaron con otras hemofilias, entre ellas, hemofilia C (n=8),

hemofilia B (n=3), hemofilia A (n=2) y alteraciones plaquetarias (n=5). El resto de los pacientes (n=39) tuvieron resultados normales para todas las pruebas de laboratorio.

Los valores normales limítrofes representaron la primera limitante del estudio. En algunos casos, a los pacientes se les hizo la invitación de realizarse nuevamente los estudios. En este sentido, una de las pacientes que originalmente se excluyó del diagnóstico de EvW regresó al laboratorio tres meses después de su primera toma de muestras. Originalmente, los resultados del primer análisis arrojaron niveles del FVIII (108%), VWF:Ag (68 UI/dL) y VWF:RCo (58 UI/dL) aparentemente normales. La única prueba alterada fue el TH (100 min). En la segunda toma de muestras, se determinó la RIPA encontrándose resultados disminuidos (35%); inmediatamente, este resultado nos sugirió repetir las pruebas de escrutinio, observándose prolongación del TTPa de más de 5 s con respecto al plasma testigo. Este resultado correlacionó con niveles bajos del FVIII y VWF:Ag. Desafortunadamente no se estableció el subtipo de la enfermedad debido a que ya no se determinaron la totalidad de las pruebas diagnósticas.

La segunda limitante del estudio es que no se determinó la prueba que evalúa la capacidad de unión del vWF al colágeno (VWF:CB). Es la prueba más eficiente para diferenciar la EvW tipo 1 de la EvW tipo 2A y tipo 2B en el laboratorio.⁴³ Debido a que la prueba no se incluyó en el estudio fue necesario realizar el análisis multimérico del vWF en todos los pacientes con sospecha de EvW, ya que en algunos pacientes los resultados de la relación VWF:RCo/VWF:Ag son ≥ 0.6 en pacientes con EvW tipo 2A y tipo 2B. El problema principal radica en el diagnóstico de la EvW tipo 2M. Normalmente se pensaba que la EvW tipo 2M

era exclusiva de alteraciones del dominio A1 del vWF que afectaban su interacción con las plaquetas. Sin embargo, esta teoría se vino abajo cuando en algunos pacientes se encontraron resultados anormales de la prueba VWF:CB, sin alteraciones en la polimerización del vWF.⁴⁴ En otras palabras, para identificar al 100% de los pacientes con EvW tipo 2M es indispensable determinar las pruebas VWF:RCo y VWF:CB. Con base en esta última idea, existe la posibilidad de que algunos pacientes con EvW tipo 2M se hayan diagnosticado con EvW tipo 1. También es factible suponer que entre los pacientes sin diagnóstico de EvW, la determinación de la prueba VWF:CB hubiera esclarecido los resultados.

La tercera limitante fue que no determinamos la prueba que evalúa de capacidad de unión del vWF al FVIII (VWF:FVIII B). En 2 pacientes se sospechó de EvW tipo 2N. Ambos pacientes se caracterizaron por presentar niveles plasmáticos muy bajos del FVIII que de manera inicial nos hizo sospechar de HA moderada. Sin embargo, el hecho de que los niveles plasmáticos bajos de VWF:RCo y VWF:Ag no fueran proporcionales a los del FVIII, estableció las bases para sospechar de EvW tipo 2N. En un paciente se determinó la farmacocinética del FVIII, los resultados fueron compatibles con EvW tipo 2N, sin embargo, debido a que no se realizó la prueba VWF:FVIII B, la cual es el estándar de oro para esta enfermedad³⁵, el diagnóstico de laboratorio no fue definitivo.

Es importante mencionar que a nivel mundial se están desarrollando pruebas de laboratorio más sensibles que las actualmente utilizadas para diagnosticar EvW. Básicamente, los esfuerzos se centran en la prueba de VWF:RCo. El hecho de utilizar el antibiótico

ristocetina como elemento fundamental para evaluar la interacción del vWF con las plaquetas es el principal factor por el cual se cuestiona la prueba VWF:RCo. Su variabilidad analítica también fue un factor importante para no usar más esta prueba; sin embargo, los resultados de un estudio demostraron que la adición de ristocetina a las pruebas comerciales de VWF:RCo incrementa la sensibilidad de la prueba.⁴⁵ Entre las nuevas opciones para evaluar la afinidad del vWF a las plaquetas están las pruebas que usan ristocetina para inducir la unión del vWF a la glicoproteína Ib recombinante (VWF:GPIbR), las pruebas que se basan en la unión espontánea del vWF a una glicoproteína Ib alterada (VWF:GPIbM) y las pruebas basadas en el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra un epítipo del dominio A1 del vWF (VWF:Ab).⁴⁶ En México, se utilizan las pruebas basadas en anticuerpos monoclonales, pero para nuestra mala fortuna la Sociedad Internacional para el estudio de la Hemostasia y Trombosis (ISTH) no las considera como pruebas funcionales. Por esta razón, la prueba VWF:RCo continúa siendo la única opción para estudiar la afinidad del vWF a su receptor plaquetario.

En México existen sólo tres publicaciones relacionados con el diagnóstico de la EvW^{15,47,48}, lo que hace evidente que para la mayoría de los laboratorios del país la experiencia diagnóstica en EvW sea mínima. El problema se engrandece aún más cuando se revisa la guía de práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento de EvW que difunde la Secretaría de Salud de nuestro país. Es vergonzoso enterarse de la falta de seriedad con que fue escrita dicha guía, no sólo se observan errores ortográficos o de redacción, sino también mala terminología de las pruebas y un seguimiento inadecuado en el algoritmo diagnóstico propuesto.⁴⁹ Si comparamos el algoritmo diagnóstico de los países nórdicos³⁷ con el de la

Secretaria de Salud, se hace muy evidente el atraso inminente que vive nuestro país en relación al conocimiento de la EvW.

Este año se publicó un artículo de revisión en el que se describe un algoritmo de laboratorio para diagnosticar EvW, los autores son mexicanos y aunque la intención fue buena, el algoritmo propuesto presenta deficiencias francas que podrían confundir a los lectores interesados en el tema. El **anexo b** muestra el algoritmo diagnóstico propuesto por la Secretaria de Salud de nuestro país y el recientemente publicado en la Gaceta Médica de México, así como el de la guía nórdica.^{37,49,50}

Finalmente, con base en nuestros resultados y la experiencia que he adquirido en mi estancia en la Unidad de Investigación, elaboré un algoritmo de laboratorio para el diagnóstico de la EvW (**ver anexo c**). Sin embargo, considero que el algoritmo diagnóstico de EvW no debe ajustarse a las condiciones de infraestructura de cada país, ya en países no desarrollados como el nuestro que difícilmente tiene acceso a todas las pruebas de laboratorio, el empleo de sólo unas cuantas pruebas es insuficiente para diagnosticar apropiadamente a los pacientes con EvW, lo cual es preocupante debido a que el tratamiento de los pacientes depende directamente del subtipo de la enfermedad.

VIII. CONCLUSIONES.

1. Dada la dificultad técnica en el laboratorio y que no siempre se diagnostica la EvW en un sólo análisis, la prevalencia real de esta enfermedad en México y en el mundo aún se desconoce.

2. Los resultados normales para el TTPa, TH y actividad del FVIII no excluyen el diagnóstico de EvW.
3. El TH esta siempre prolongado en EvW tipo 2A, tipo 2B y tipo 2M, pero no así en los pacientes con EvW tipo 1.
4. El diagnóstico de EvW y sus tipos requieren indispensablemente de las pruebas: VWF:Ag, FVIII, VWF:RCo, VWF:CB, VWF:FVIIIIB, RIPA y análisis multimérico del vWF. La falta de alguna de estas pruebas limita el diagnóstico de EvW.
5. Los resultados de la relación $VWF:RCo/VWF:Ag \leq 0.6$ correlacionaron adecuadamente con lo observado en el análisis multimérico del vWF en los pacientes con EvW tipo 2A y tipo 2B.
6. En la EvW tipo 2M, es indispensable que los resultados de las pruebas VWF:Ag y VWF:RCo sean estadísticamente semejantes, de lo contrario se corre el riesgo de diagnosticar erróneamente a pacientes con EvW tipo 1 como EvW tipo 2M y viceversa.
7. Se diagnosticaron 37 pacientes mexicanos con EvW en sus diferentes tipos. La EvW tipo 1 fue la más frecuente, seguida de la EvW tipo 2M, tipo 2B, tipo 2A y por último el tipo 3.
8. En 22 pacientes se mantuvo la sospecha clínica de EvW, sin embargo no fue posible clasificar a la enfermedad con base en los resultados de laboratorio.
9. Existe la posibilidad de que un número mayor de pacientes fueran diagnosticados con EvW tipo 2M si se hubiera realizado la prueba VWF:CB.
10. En dos pacientes se sospechó de EvW tipo 2N, sin embargo el diagnóstico no fue definitivo porque no se realizó la prueba VWF:FVIIIIB.
11. Con base en nuestros resultados y las limitaciones del estudio consideramos que el algoritmo diagnóstico de laboratorio es el mismo para todas las poblaciones mundiales. No

observamos diferencias entre el algoritmo propuesto en este estudio y los ya utilizados a nivel mundial.

IX. PERSPECTIVAS.

1. Realizar la prueba VWF:CB en las muestras de los pacientes con EvW tipo 1.
2. Confirmar mediante estudios de farmacocinética del FVIII y la prueba VWF:FVIII B, si los pacientes con sospecha de EvW tipo 2N tienen esta enfermedad.
3. Repetir el diagnóstico de EvW en los pacientes con resultados limítrofes en las pruebas de laboratorio.
4. Identificar mutaciones y/o polimorfismos del gen del vWF en los pacientes con EvW.
5. Realizar diagnóstico de EvW en población indígena mexicana.

X. CONSIDERACIONES ÉTICAS.

El presente proyecto requirió de seres humanos para su realización, pero únicamente se trabajó con las muestras sanguíneas de pacientes voluntarios previamente informados acerca del objetivo del estudio y bajo su consentimiento, por lo que no se requirieron consideraciones especiales en este punto. Previo a la recolección de las muestras, todos los pacientes recibieron información oral y escrita sobre las características del estudio. Al aceptar participar en el mismo, se les solicitó que firmaran un consentimiento informado (si sabían leer y escribir). Toda la información obtenida se guardó bajo confidencialidad, de acuerdo a lo establecido en los principios de la Declaración de Helsinki de 1975 y enmendada en 1989. Los procedimientos utilizados durante este proyecto se hicieron acordes con las normas éticas, con el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia

de Investigación para la Salud y con los códigos y normas internacionales vigentes para las buenas prácticas de la investigación clínica. **Ver anexos d y e.**

XI. BIBLIOGRAFÍA.

1. Jiménez R. Actualidades en hemostasia: Actualidades en el diagnóstico y la clasificación de la enfermedad de von Willebrand. *Gaceta Médica de México.* 2002;138:S55-S57.
2. Favalaro EJ. Von Willebrand Disease: Local Diagnosis and Management of a Globally Distributed Bleeding Disorder. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis.* 2011;37:440-455.
3. Kasper CK. Von Willebrand Disease: An introductory discussion for young physicians. Octubre 2005.
4. Lilicrap D, James P. Enfermedad de von Willebrand: Introducción para médicos de atención primaria. *Federación Mundial de Hemofilia.* 2009;47:1-8.
5. Quintana GS. Actualidades en la hemostasia: Nuevos conceptos en la fisiología de la coagulación. *Gaceta Médica de México.* 2002;138:S47-S51.
6. Lutze G, Breyer J, Naumann Ch. Useful Facts about Coagulation Questions/Answers. General Principles. 2a ed. Mannheim: Roche Diagnostics GmbH .2000;1:17-71.
7. Majluf CA. Hematología básica. Fisiología del sistema de coagulación. México: GARMARTE Editorial. 2006;28:48-62.
8. Otero AM. Hemostasis y Trombosis. Conceptos generales de la hemostasis. 2ª ed. Uruguay: ARENA 2006;2:37-42.
9. Fischer EB, Thomas BK, Schlokot U, Dorner F. Triplet structure of human von Willebrand factor. *Biochem J.* 1998;331:483-488.

10. Peyvandi F, Garagiola I, Baronciani L. Role of von Willebrand factor in the haemostasis. *Blood Transfus* 2011;9:s3-s8.
11. De Meyer FS, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K. Von Willebrand factor to the rescue. *Blood* 2009;113:5049-5057.
12. Luo PG, Ni B, Yang X, Wu YZ. Von Willebrand Factor: More a Regulator of Hemostasis and Thrombosis. *Acta Haematol.* 2012;128:158-169.
13. Favaloro EJ, Bodó I, Israels SJ, Brown SA. Von Willebrand disease and platelet disorders. *Haemophilia.* 2014;20:59-64.
14. Navarro CD. Costo efectividad del empleo de factor VIII/factor de von Willebrand (Wilate) en el tratamiento de la enfermedad de von Willebrand. México: Instituto Politécnico Nacional, 2011.
15. Majluf CA, Velez RM, Gonzalez AA, García CJ, Berges A, Lopez SN, col. Von Willebrand's disease in Mexico: a pilot study. *Haemophilia* 2012;1-5.
16. Jiménez R. Actualidades en hemostasia: Actualidades en el diagnóstico y la clasificación de la enfermedad de von Willebrand. *Gaceta Médica de México.* 2002;138:S55-S57.
17. Levy G, Ginsburg D. Getting at the Variable Expressivity of Von Willebrand Disease. *Tromb Haemost.* 2001;86:144-148.
18. García CJ. Hematología básica. El laboratorio de hematología. México: GARMARTE Editorial 2006;29:169-173.
19. Lutze G, Breyer J, Naumann Ch. Useful Facts about Coagulation Questions/Answers. Preanalytical and Analytical Aspects. 2a ed. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim 2000;3:217-250.

20. Lena A. Aproximación al diagnóstico de trastornos de la hemostasia y la evaluación del tratamiento antitrombótico. Hemostasia y Trombosis. 2a ed. Uruguay: ARENA 2006;7:89-100.
21. Kitchen S, McGraw A, Echenagucia M. Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación, Manual de laboratorio. 2a ed. Canada: Federación Mundial de Hemofilia 2010;14:45-54.
22. Siemens Healthcare Diagnostics. Multifibren U. Alemania 2008.
23. Sans-Sabrafen J, Besses RC, Vives CJ. Hematología clínica. 4a ed. Madrid: Harcourt 2001;35:616,648-657.
24. Ruíz-Arguelles GJ. Fundamentos de hematología. 4a ed. México: Editorial Médica Panamericana 2009;1:23.
25. Lewis SM, Bain BJ, Bates I. Hematología práctica. 10ª ed. Madrid: Elsevier 2008;3:44-4.
26. Kitchen S, McGraw A, Echenagucia M. Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación, Manual de laboratorio. 2a ed. Canada: Federación Mundial de Hemofilia 2010;26:76-79.
27. Siemens Healthcare Diagnostics. vWF Ag. Alemania 2012.
28. Kitchen S, McGraw A, Echenagucia M. Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación, Manual de laboratorio. 2a ed. Canada: Federación Mundial de Hemofilia 2010;29:83-86.
29. Siemens Healthcare Diagnostics. BC von Willebrand Reagent. Alemania 2012.
30. Kitchen S, McGraw A, Echenagucia M. Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación, Manual de laboratorio. 2a ed. Canada: Federación Mundial de Hemofilia 2010;39:124-134.

31. Kitchen S, McGraw A, Echenagucia M. Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación, Manual de laboratorio. 2a ed. Canada: Federación Mundial de Hemofilia 2010;33:99-17.
32. Hernández ZE, Zavala HC, Viveros SM, Ochoa RA, Martínez MC, Reyes ME. Determinación de los multímeros del factor de von Willebrand en población Mexicana. *Cir Cir.* 2014;82:607-618.
33. Rodeghiero F, Castaman G, Dini E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood.* 1987;69:454-459.
34. Bowman M, Hopman WM, Rapson D, Lilicrap, James P. The prevalence of symptomatic von Willebrand disease in primary care practice. *J Thromb Haemost.* 2010;8:213-216.
35. Castaman G, Hillarp A, Goodeve A. Laboratory aspects of von Willebrand disease: test repertoire and options for activity assays and genetic analysis. *Haemophilia.* 2014;20:65-70.
36. Sadler JE. A revised classification of von Willebrand disease: for the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost.* 1994; 71:520–5.
37. Nordic guidelines for diagnosis and management of von Willebrand Disease. Nordic Hemophilia Council, 2013.
38. Favaloro EJ. Genetic testing for von Willebrand disease: the case against. *J Thromb Haemost.* 2010;8:6-12.
39. Casari C, Lenting PJ, Wohner N, Christophe OD, Denis CV. Clearance of von Willebrand factor. *J Thromb Haemost.* 2013;11:202-11.
40. Lisker R, Ramírez E, Babinsky V. Genetic structure of autochthonous populations of Meso-America: Mexico. *Hum Biol* 1998;68:395-404.

41. Hernández-Juárez J, Moreno-Hernández M, Ricardo-Moreno T, García-González A, García-Latorre EA, Hernández-López JR, Ramírez-San Juan E, Alvarado-Moreno A, Isordia-Salas I, Majluf-Cruz A. Reference values for blood coagulation factor activity in the Mexican population. *Rev Invest Clin.* 2014 ;66:252-260.
42. Quiroga T, Goycoolea M, Belmont S, Panes O, Aranda E, Zuñiga P, col. Quantitative impact of using different criteria for the laboratory diagnosis of type 1 von Willebrand disease. *Tromb Haemost.* 2014;12:1238-1243.
43. Ni Y, Nesrallah J, Agnew M, Geske FJ, Favaloro EJ. Establishment and characterization of a new and stable collagen-binding assay for the assessment of von Willebrand factor activity. *Int J Lab Hematol.* 2013;35:170-6.
44. Favaloro EJ. An update on the von Willebrand factor collagen binding assay: 21 years of age and beyond adolescence but not yet a mature adult. *Semin Thromb Hemost.* 2007;33:727-744.
45. Hillarp A, Stadler M, Haderer C, Weinberger J, Kessler CM, Römisch J. Improved performance characteristics of the von Willebrand factor ristocetin cofactor activity assay using a novel automated assay protocol. *J Thromb Haemost.* 2010;8:2216-23.
46. Bodó I, Eikenboom J, Montgomery R, Patzke J, Schneppenheim R, Di Paola J. Platelet-dependent von Willebrand factor activity. Nomenclature and methodology: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2015;13:1345-50.
47. Ambriz-Fernández R, Aviles-Miranda A, Reyna Fragoso MP, Ballesteros L, Pizzuto J. Enfermedad de von Willebrand. Informe de 60 casos de 24 familias en Mexico. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 1984; 22:241–7.

48. Morales-De la Vega A, Reyes-Maldonado E, Martínez-Murillo C, Quintana-González S. Type 2N von Willebrand disease (Normandy). *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2008;46:55-62.
49. Diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de von Willebrand. México; Secretaria de Salud, 2010.
50. Padilla-Romo MG, Jaloma-Cruz AR. Algoritmo diagnóstico para la enfermedad de von Willebrand (EvW) en población mexicana. *Gaceta Médica de México* 2015;151:399-402.

XII. ANEXO

a. Técnica del análisis electroforético de los multímeros del vWF.

Reactivos

- Buffer y gel de separación
 - Buffer de separación TRIS 0.375M 0.1% SDS a pH=8.8 (500 mL)
Pesar 22.7 g TRIS + 0.5 g SDS y aforar con agua destilada y ajustando pH con HCl.
 - Gel de separación 1.6%
Pesar 1.6 g de agarosa con 100 mL de buffer TRIS 0.375M.

- Buffer y gel de concentración.
 - Buffer de separación TRIS 0.125M 0.1% SDS a pH=6.8 (500 mL)
Pesar 7.57 g TRIS + 0.5g SDS, afora con agua destilada y ajustar pH con HCl.
 - Gel de separación 0.8%
Pesar 0.4 g de agarosa en 50 mL de buffer TRIS 0.125M.

- Buffer's electroforesis.
 - Buffer stock electroforesis 10x (500 mL)
Pesar 15.15 g TRIS + 72.1 g glicina + 5 g SDS y aforar con agua destilada.
 - Buffer electroforesis 1:10 (1000 mL) pH=8.35
100 mL de buffer stock 10x y aforar con agua destilada.

- Buffer's de transferencia
 - Ánodo pH=8.3 (1000 mL)
Pesar 3.082 g TRIS + 14.412 g glicina + 200 mL metanol 20% y aforar con agua destilada.
 - Cátodo pH=8.3 (500 mL)
Pesar 1.541 g TRIS + 7.206 g glicina + 3.75 mL SDS 10% y aforar con agua destilada.

- Buffer's muestra
 - Buffer stock muestra pH=8.0 (100 mL)
Pesar 1.21 g TRIS + 0.372 g EDTA y aforar con agua destilada.
 - Buffer muestra 1:10 (10 mL)
Pesar 0.2 g SDS + 0.48 g urea + 1 mL de buffer stock muestra y aforar con agua destilada.

- Buffer fosfatos pH=7.3 (1000 mL)
Pesar 0.2 g cloruro de potasio + 0.19 g fosfato potásico monobásico + 1.14 g fosfato sódico dibásico + 8.01 g cloruro sódico y aforar con agua destilada.

- Solución de bloqueo. (prepararse unos minutos antes de su uso)
Pesar 5.0 g leche descremada en polvo + 0.3 g albúmina y adicionar 100 mL de buffer fosfatos, agitar hasta que no ver presencia de grumos.

- Anticuerpo primario (30 mL, debe prepararse unos minutos antes de su uso)
Colocar 40 μ L anticuerpo primario + 0.2 g albúmina y disolver con buffer fosfatos.

- Anticuerpo secundario (30 mL, debe prepararse unos minutos antes de su uso)
Colocar 11 μ L anticuerpo primario + 0.2 g albúmina y disolver con buffer fosfatos.

- Solución Biotinilada-Peroxidasa-Avidina (30 mL, debe prepararse 30 minutos antes de su uso)
Colocar 40 μ L avidina + 40 μ L peroxidasa biotinilada y homogenizar con buffer fosfatos.

- Solución reveladora (30 mL, debe prepararse unos minutos antes de su uso)
Pesar 0.03 g cloruro de níquel + 0.02 mg DAB y disolver en buffer fosfatos, filtrar y adicionar 20 μ L peróxido al momento de utilizar.

Técnica.

✓ Preparación del gel

1. Disolver la agarosa para separación en el buffer TRIS 0.375M, una vez polimerizada la agarosa, se refrigera a 4°C alrededor de 15 minutos.
2. Se retira una porción del gel para colocar el gel de concentración, previamente disuelto y colocándose el peine antes de vaciar el gel.
3. Una vez polimerizada la agarosa, se debe mantener 2 a 8°C toda la noche, colocándole un poco de buffer de electroforesis 1:10, a manera de que no se seque el gel.

✓ Preparación de las muestras a analizar

1. En tubos de plástico pequeños colocar 20 µL de la muestra + 180 µL de buffer muestra 1:10 y mezclar.
2. Incubar las muestras a 60°C / 20 minutos.
3. Adicionar 10 µL azul de bromofenol 1% y mezclar.

✓ Electroforesis

1. Humedecer el gel de agarosa con el buffer de electroforesis 1:10 procurando no llenar los pozos.
2. Antes de colocar las muestras en los pozos, secar cada uno con papel filtro para poder adicionar 20 µL de la muestra a dilución 1:10.
3. Se llenara la cámara de electroforesis hasta el raz del gel, sin llenar los pozos con el buffer de electroforesis 1:10.
4. Iniciar la electroforesis a 70 V, manteniendo el buffer a la temperatura adecuada. Dejar correr hasta que las muestras salgan de los pozos.
5. Parar la electroforesis y destapar la cámara para adicionar más buffer de electroforesis 1:10 hasta cubrir por completo la agarosa.
6. Continuar con la electroforesis a 70 V hasta que el frente de corrimiento alcance el gel de separación, se disminuirá la corriente a 65 V.
7. Mantener la temperatura alrededor de 5°C durante toda la electroforesis.
8. Parar la electroforesis de 1 a 2 cm antes del borde final del gel.

✓ Transferencia

Montaje del sándwich.

1. Antes de colocar el papel filtro, la nitrocelulosa y el gel en las soluciones se debe cortar a manera de que queden del mismo tamaño y así evitar la generación de burbujas durante la transferencia.
2. En un recipiente que contenga la solución de ánodo colocar el papel filtro, el gel y la nitrocelulosa, mientras que en otro recipiente que contenga la solución de cátodo otro papel filtro, dejándolos hasta que se humedezcan por completo.
3. Ir colocando cada uno sobre la cámara de transferencia y pasar un rodillo suavemente y de manera continua para eliminar las burbujas.
4. Transferir a 151 mA durante 45 minutos o 1 hora y media dependiendo el tamaño del gel.

✓ Bloqueo

Después de haber transcurrido el tiempo de transferencia, se colocara la nitrocelulosa en un recipiente con la solución de bloqueo mínimo 2 horas, de preferencia dejar toda la noche bloqueando y agitando.

✓ Procesamiento de la nitrocelulosa

Conjugación con el anticuerpo primario

1. Después de que transcurrió el tiempo de bloqueo, se lavara una 6 veces con Tween 20 al 0.1% durante 30 minutos.
2. Se dejará incubar a temperatura ambiente por una hora con agitación constante la membrana de nitrocelulosa con el anticuerpo primario.

Conjugación con el anticuerpo secundario

1. Después de que transcurrió el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, se lava 6 veces con Tween 20 al 0.1% durante 30 minutos.
2. Dejar incubando a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación constante la membrana de nitrocelulosa con el anticuerpo secundario.

Reacción Biotinilada Peroxidasa-Avidina

1. Después de que transcurrió el tiempo de incubación con el anticuerpo secundario, se lava 6 veces con Tween 20 al 0.1% durante 30 minutos.
2. Incubar la membrana de nitrocelulosa a temperatura ambiente en total oscuridad durante 1 hora y con agitación constante con la solución de Biotinilada-Peroxidasa-Avidina.

✓ Revelado

1. Después de que transcurrió el tiempo de incubación en oscuridad, se lava 6 veces con Tween 20 al 0.1% durante 30 minutos sin prender la luz.
2. Colocar la solución reveladora, agitando constantemente hasta que sean visibles las bandas quitar el reactivo y enjuagar o lavar con agua destilada hasta eliminar el exceso de revelador.

b. Antecedentes de algoritmos para diagnóstico de EvW.

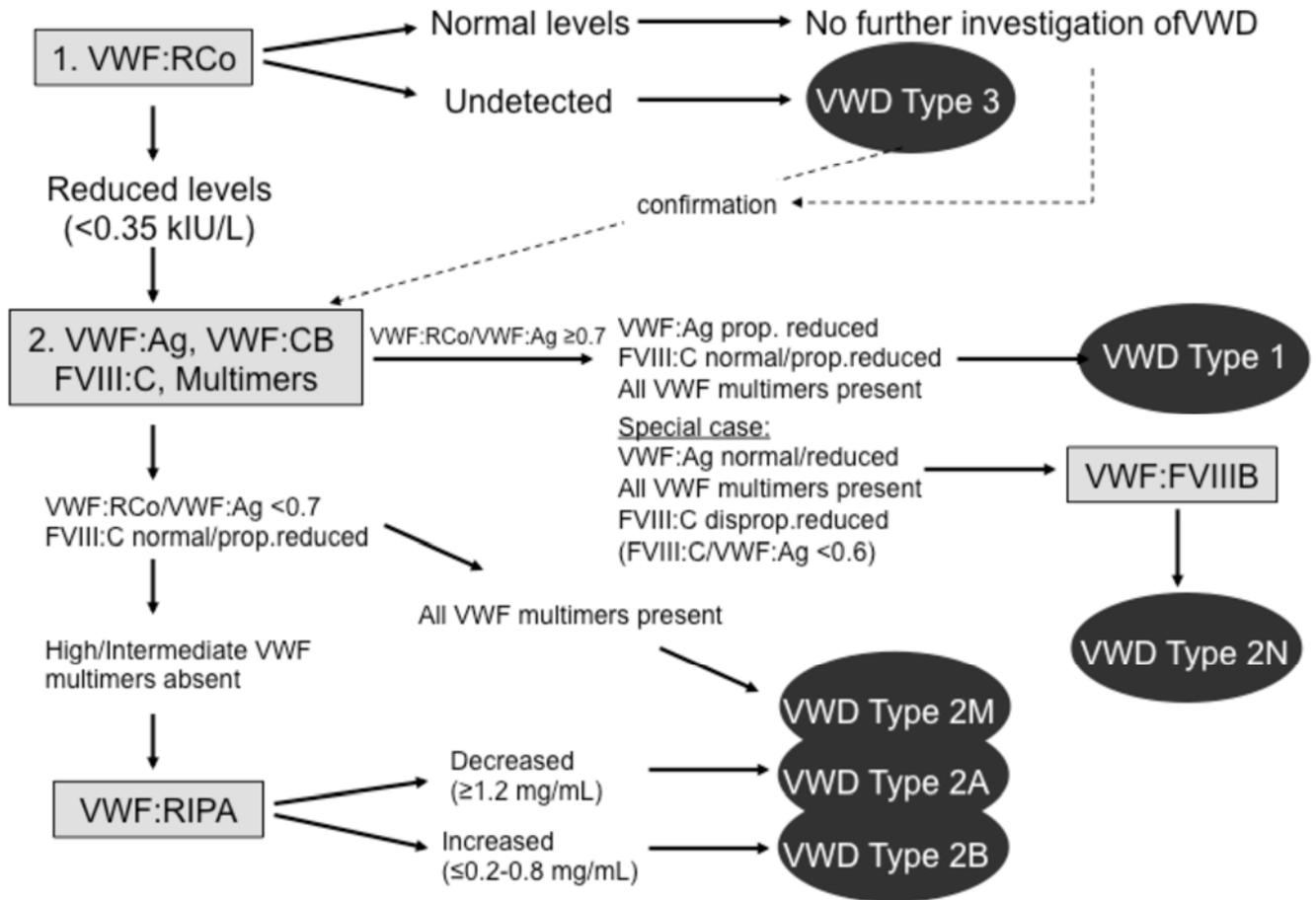


Fig 7. Ejemplo de algoritmo diagnóstico de la guía nórdica para laboratorio de sospecha de EvW.³⁷

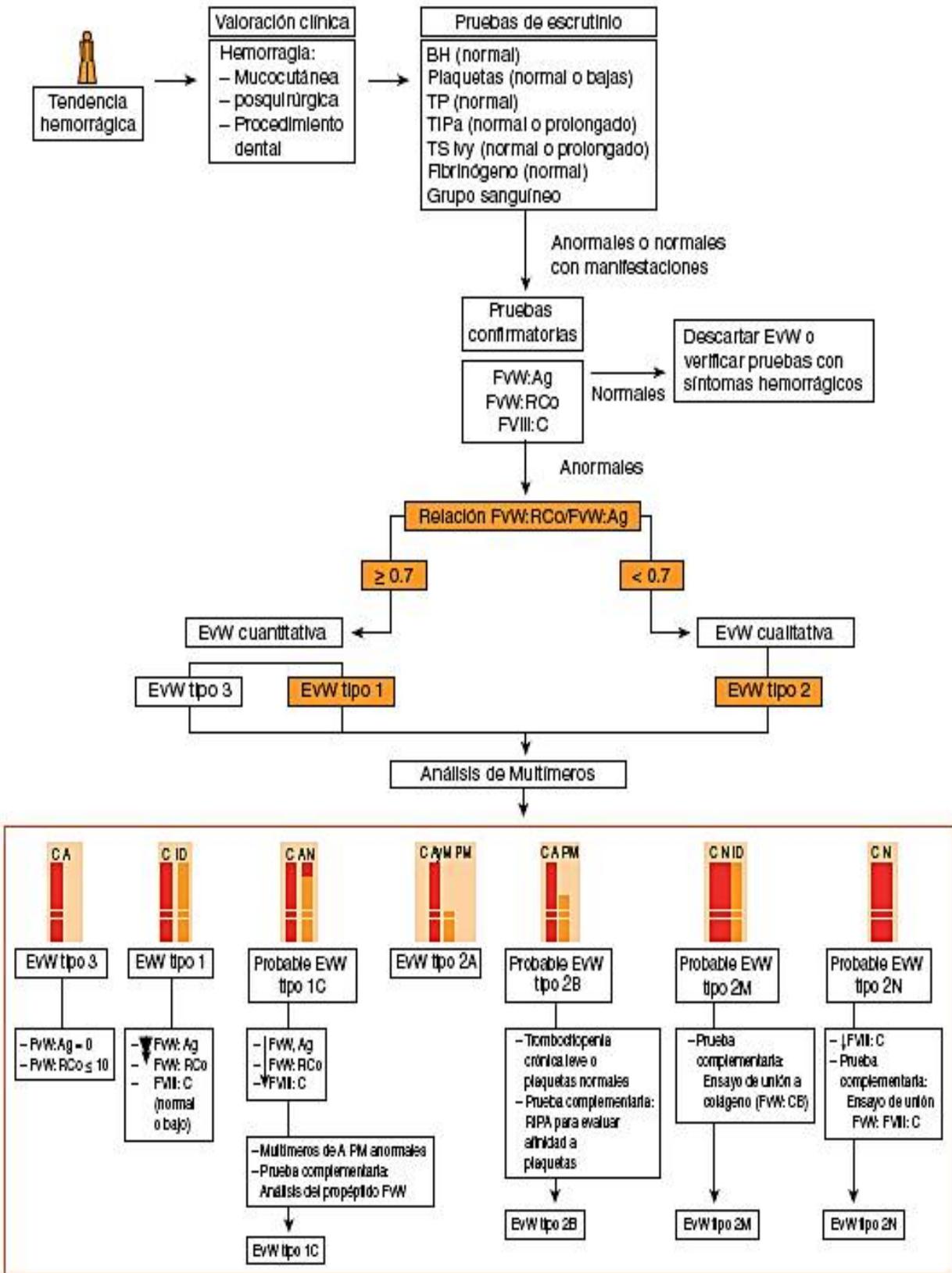


Fig 8. Algoritmo diagnóstico de la publicación en la Gaceta Médica de México.⁵⁰

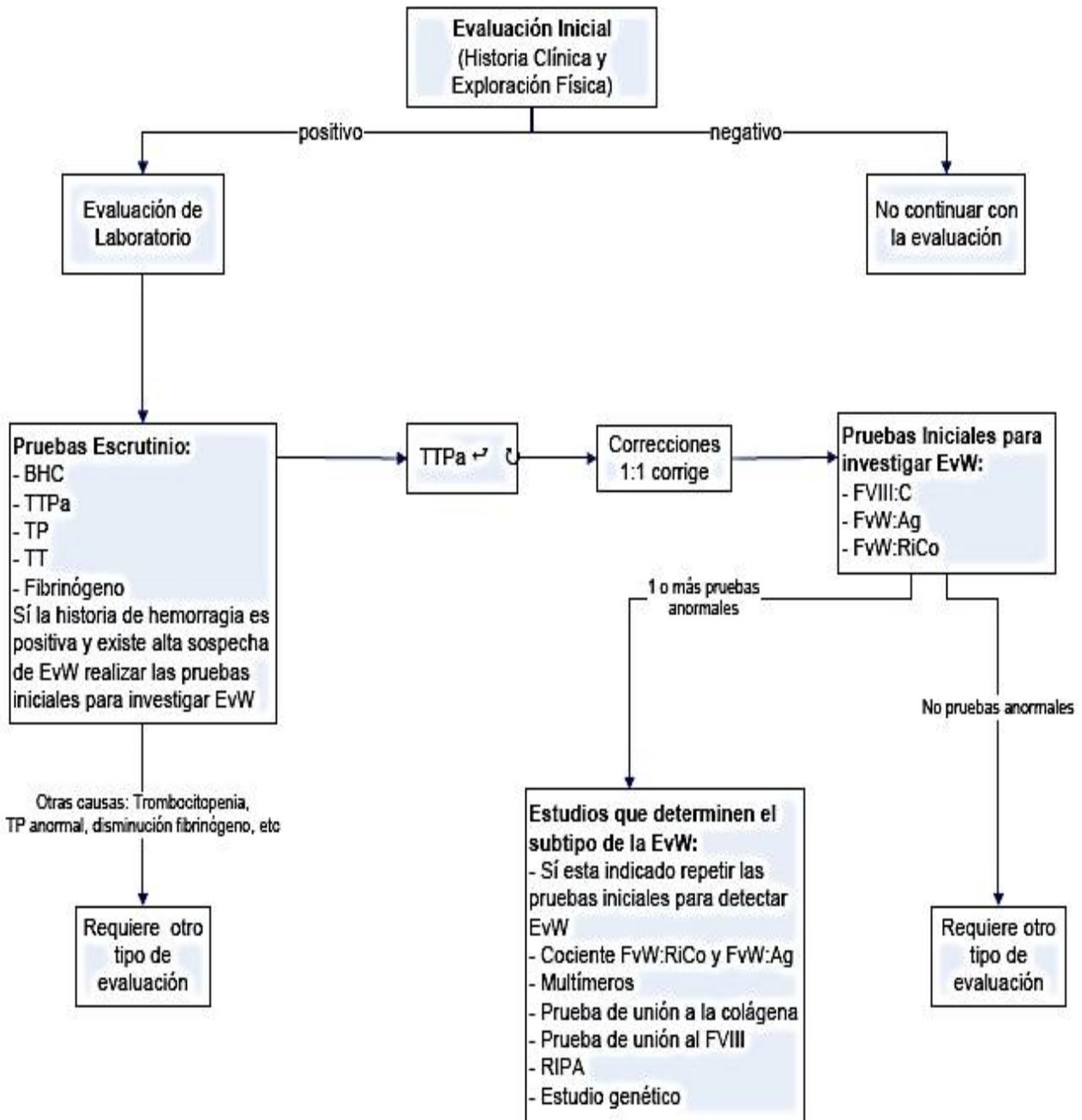
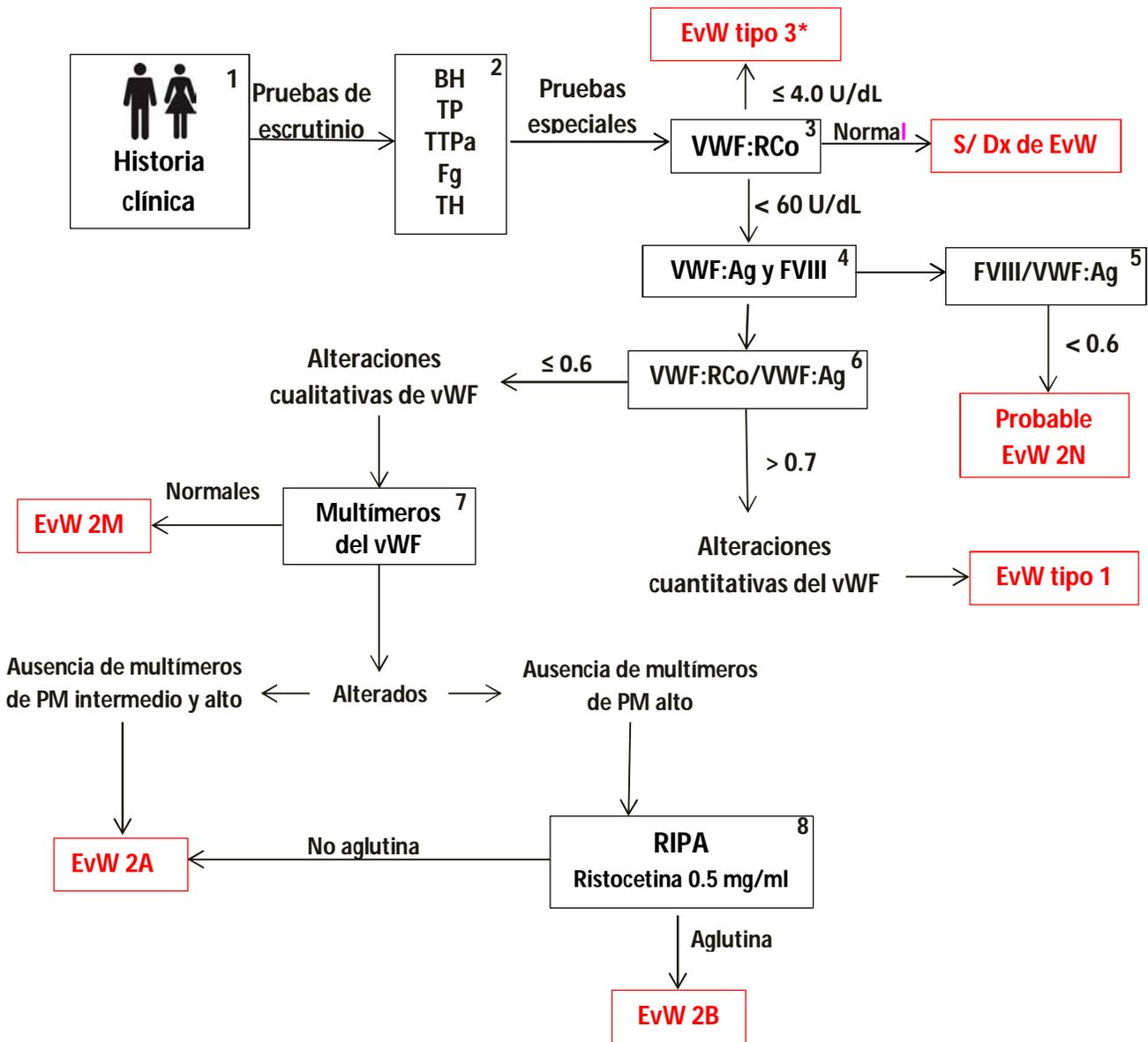


Fig 9. Algoritmo diagnóstico de EvW de la guía del Sector Salud.⁴⁹

c. Propuesta de algoritmo diagnóstico en laboratorio de EvW en México.



EvW tipo 3*: El Dx se debe confirmar con el análisis de los multímeros del vWF.

1. Historia clínica con o sin manifestaciones clínicas.
2. Pruebas de escrutinio donde BH, TP, fibrinógeno salen normales, mientras que TTPa, PLT y TH puede salir normal o alterado, sin descartar EvW.
3. VWF:RCo es la primer prueba especial que se debe realizar para seguir con el estudio.
4. VWF:Ag y FVIII son pruebas que ayudan a saber el tipo de EvW.

c. Hoja de información del estudio.

HOJA DE INFORMACIÓN.

“DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND EN PACIENTES MESTIZOS MEXICANOS”

Estimado Sr. o Sra.

Esta carta es para solicitar su colaboración en el estudio que beneficiara tanto a su persona como al trabajo de investigación **“DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND EN PACIENTES MESTIZOS MEXICANOS”**. Estamos buscando en este estudio darle un diagnóstico confiable, certero y oportuno para que el médico le indique cual será el tratamiento adecuado a su padecimiento, si es que presenta alguno. La sangre que usted donará se obtendrá con material completamente nuevo, por lo que no corre ningún riesgo de contraer alguna enfermedad. Asimismo, la cantidad de sangre que se extraerá es mínima (17.5 mL) y no debe causarle otra molestia más que en el momento de la venopunción. Los datos que le solicitamos son únicamente con propósitos de investigación y también nos servirán para que en caso de que usted tenga alguna alteración, sea informado inmediatamente y reciba consejo médico adecuado. Ninguna de las muestras que le tomemos será utilizada para obtener ganancias de ninguna clase, ya que la información que se obtenga de su sangre sólo será utilizada para fines científicos.

Espero contar con su colaboración y de antemano infinitas gracias.

A T E N T A M E N T E.

pQFB Paola Itzel Carmona Olvera.

Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis.

HGR No.1 Dr. Carlos Mac Gregor Sánchez Navarro, IMSS

d. Hoja de aceptación.

**HOJA DE ACEPTACIÓN PARA DONACIÓN DE MUESTRA SANGUÍNEA.
“DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND EN PACIENTES
MESTIZOS MEXICANOS”**

Por medio de este conducto, yo _____
estoy enterado (a) del estudio denominado **“DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND EN PACIENTES MESTIZOS MEXICANOS”**, aceptando la donación de 17.5 mL de sangre. Asimismo, se me informó que mi sangre y los resultados que se obtengan de ella, sólo serán utilizados con fines científicos, negando el uso comercial de los mismos. Por último, se me informó que, en caso de que yo presente alguna alteración relacionada con la enfermedad del estudio u otra, se me dará aviso inmediatamente de ella con ayuda de un médico especialista.

ATENTAMENTE.

Nombre y firma : _____

Procedencia: _____

Fecha: _____