



Determinación de los multímeros del factor von Willebrand en población mexicana

RESUMEN

Antecedentes: la enfermedad de von Willebrand es un padecimiento hereditario en el que la estructura, función y concentración del factor de von Willebrand están alteradas y, en consecuencia, también la interacción plaqueta-factor de von Willebrand- endotelio. En México no hay registros epidemiológicos de la enfermedad, sólo se han efectuado algunos estudios aislados desde el punto de vista clínico y hematológico.

Material y métodos: estudio retrospectivo efectuado en 155 mexicanos mestizos, 75 de ellos con diagnóstico presuntivo de enfermedad de von Willebrand, 15 con sospecha de hemofilia A y 65 donadores sanos (testigos). Se realizaron pruebas: básicas de coagulación, especiales y de clasificación: análisis de la composición multimérica.

Resultados: 15 pacientes se diagnosticaron con hemofilia A; de los 75 sujetos con sospecha de enfermedad de von Willebrand se diagnosticaron 50 de la manera siguiente: tipo 1 (62%), tipo 2 (22%) [subtipos: 2A (14%), 2B (2%) y 2N (6%)] y tipo 3 (16%).

Conclusión: el análisis de los multímeros del factor de von Willebrand es un método que cumple con las características adecuadas para el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand, por lo que es necesario implementar esta metodología para su estudio y mejorar su diagnóstico específico.

Palabras clave: multímeros del factor de von Willebrand, enfermedad de von Willebrand.

Edgar Hernández-Zamora¹
César Zavala-Hernández²
Martha Eva Viveros-Sandoval³
Ángeles Ochoa-Rico⁴
Carlos Martínez-Murillo⁵
Elba Reyes-Maldonado⁴

¹ Servicio de Genética, Instituto Nacional de Rehabilitación.

² Laboratorio Central de Patología Clínica, Instituto Nacional de Rehabilitación.

³ Laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas Dr. Ignacio Chávez, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

⁴ Laboratorio de Citología. Departamento de Morfología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.

⁵ Clínica de Hemostasia y Trombosis, Hospital General de México Eduardo Liceaga, México DF.

Determination of von Willebrand factor multimers in Mexican population

ABSTRACT

Background: Von Willebrand disease is an inherited disease in which the structure, function, and concentration of von Willebrand factor are altered, as well as the platelet von Willebrand factor endothelium interaction. In Mexico there are no epidemiological records of the disease. Only a few isolated studies have been reported from the clinical and hematological standpoint.

Methods: We studied 155 Mexican Mestizos: 75 with presumptive diagnosis of von Willebrand disease, 15 with suspected diagnosis of

Recibido: 22 de noviembre, 2013

Aceptado: 19 de junio, 2014

Correspondencia:

Dra. Elba Reyes Maldonado
Prol. Carpio y Plan de Ayala s/n
11340 DF. México.
Tel.: 57296300, ext. 62393
elbareyesm@gmail.com

hemophilia A and 65 healthy donors (controls). Basic coagulation tests, special tests and classification test (analysis of multimeric composition) were carried out.

Results: There were 15 patients with clinical diagnosis of hemophilia A, 75 patients with suspected von Willebrand disease of which 50 were diagnosed as the following types and subtypes: Type 1 (62%), Type 2 (22%) [subtypes: 2A (14%), 2B (2%), and 2N (6%)] and Type 3 (16%).

Conclusion: It has been reported that analysis of von Willebrand factor is a method that meets the characteristics for the diagnosis of von Willebrand disease. It is necessary to implement this methodology to study and improve the specific diagnoses.

Key words: Multimers of vWF, von Willebrand disease.

ANTECEDENTES

La enfermedad de von Willebrand constituye un grupo heterogéneo de padecimientos hereditarios en los que la estructura, función y concentración del factor de von Willebrand (VWF) están alteradas. Como en varias coagulopatías, se encuentra afectada principalmente la hemostasia primaria; en este caso particular, en la interacción plaqueta-VWF-endotelio, ya que es un trastorno que se distingue por hemorragia mucocutánea de intensidad variable.^{1,2}

El gen del factor de von Willebrand se localiza en el cromosoma 12, en el brazo corto distal de la región p13.2; codifica para una glicoproteína que se sintetiza en megacariocitos, plaquetas y células endoteliales.³ Su síntesis se inicia como un pro-péptido en el retículo endoplásmico, forma dímeros mediante puentes disulfuro; posteriormente se transporta al aparato de Golgi, donde la proteína vuelve a crear puentes disulfuro y, por consiguiente, series de multímeros de diferentes tamaños que van desde dímeros simples (225 kDa) hasta multímeros (de más de 20 unidades, ~120,000 kDa).^{4,5}

DIAGNÓSTICO CLÍNICO

La historia clínica permite al médico hacer una aproximación diagnóstica, junto con los signos y síntomas que experimentan los pacientes, así como los diversos factores que modifican las concentraciones del factor de von Willebrand. Es importante tomar en cuenta las recomendaciones descritas en las guías de práctica clínica y los exámenes del laboratorio químico hematológico, como las pruebas básicas de hemostasia y las pruebas confirmatorias, que incluyen el estudio de los multímetros del factor de von Willebrand que proporcionan información de gran utilidad y que debe ser interpretada en relación con el contexto clínico, lo que brinda mayor posibilidad de un diagnóstico certero y tratamiento adecuado para estos pacientes.

Exámenes de laboratorio químico-clínico

Pruebas básicas de hemostasia

El diagnóstico de laboratorio químico clínico de las alteraciones hemorrágicas precisa de procedimientos de escrutinio para valorar la hemostasia



primaria y secundaria, que comprenden la cuenta completa de elementos formes de la sangre, como plaquetas, tiempo de sangrado, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial activada y tiempo de trombina. El tiempo de sangrado es especialmente útil en la evaluación de los trastornos de la hemostasia primaria, que es el caso de la enfermedad de von Willebrand; existen varios métodos para realizarlo, como el de Duke, Ivy o técnicas automatizadas. El tiempo de protrombina, el tiempo de tromboplastina parcial activada y el tiempo de trombina se utilizan para evaluar la hemostasia secundaria; el tiempo de tromboplastina parcial activada puede ser prolongado, debido a la disminución en las concentraciones del factor VIII (FVIII) de la coagulación; sin embargo, en ocasiones puede encontrarse normal.⁶

Pruebas confirmatorias

Después de que la historia clínica, los antecedentes personales y familiares y las pruebas de escrutinio han orientado al diagnóstico de enfermedad de von Willebrand, se deben realizar pruebas que permitan confirmarlo. El VWF es una glicoproteína relacionada con el FVIII; en los pacientes con enfermedad de von Willebrand pueden encontrarse anomalías en ambas proteínas. El FVIII se evalúa mediante la prueba de la actividad coagulante (FVIII:C), que puede estar disminuida incluso en 90% en estos pacientes debido a la deficiencia del factor de von Willebrand.⁷

Los métodos inmunológicos que miden la concentración del antígeno del factor von Willebrand (FVW:Ag) en plasma, como el radioinmunoanálisis o el electroinmunoanálisis,^{8,9} tienen la desventaja de su baja sensibilidad. Otros métodos de mayor sensibilidad son la inmunoelectroforesis (ELISA),¹⁰ la contraelectroforesis o la electroforesis en sulfato.^{11,12} La prueba inmunológica más recomendada para la caracterización precisa del factor de von Willebrand es la inmunoelectrotransferencia en dodecilsulfato de sodio (SDS) en geles de polia-

crilamida, también denominada como prueba para el estudio de los multímeros del VWF.¹³

La función del factor de von Willebrand se analiza mediante métodos que involucran a la ristocetina. Uno de ellos es la prueba de cofactor de ristocetina (von Willebrand factor ristocetin cofactor activity, FVW:RCo), que determina la aglutinación dependiente del VWF plasmático. La otra prueba es llamada agregación plaquetaria inducida por ristocetina (ristocetin-induced platelet aggregation, RIPA).¹⁴

Prueba para el estudio de los multímeros del factor de von Willebrand

Es una técnica que evalúa de manera precisa la composición multimérica del factor de von Willebrand, y se conoce como electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE). Las muestras de plasma a estudiar son tratadas con dodecilsulfato de sodio, y los multímeros adquieren carga uniforme; en consecuencia, la separación electroforética en los geles de poliacrilamida dependerá sólo del tamaño de los multímeros. Posteriormente, se hace electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa con una corriente constante de 200 mA durante cinco horas, seguida de la unión con inmunoglobulina de conejo anti-VWF humano a 4°C toda la noche. Se realizan lavados y se incuban dos horas a temperatura ambiente, con conjugado de cabra anti IgG de conejo. Finalmente, después de varios lavados, se revela utilizando un cromógeno y peróxido de hidrógeno. Como resultado, aparecen bandas teñidas de color rojo en la parte superior, que corresponden a multímeros de alto peso molecular (APM), bandas de peso molecular intermedio (PMI) y multímeros de bajo peso molecular (BPM). El patrón multimérico en los diferentes tipos de enfermedad de von Willebrand corresponde a 1, 2M y 2N; se observan todos los tipos de

multímeros. En el tipo 2A no hay multímeros de alto peso molecular ni de peso molecular intermedio. En el tipo 2B no se prestan los multímeros de alto peso molecular, y el tipo 3 carece de multímeros (Figura 1).^{2,7}

Pruebas moleculares

Los estudios moleculares han proporcionado el conocimiento completo del gen del factor de von

Willebrand, sus características generales, interacciones y conformación, su estructura, así como sus principales variantes, sea no patológico o patológico, incluso en pacientes mexicanos en los que se ha descrito un gran número de mutaciones en él.^{15,16} Distintos autores han destacado la dificultad para establecer el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand debido a las diversas formas moleculares que adopta el factor del mismo nombre.¹⁷

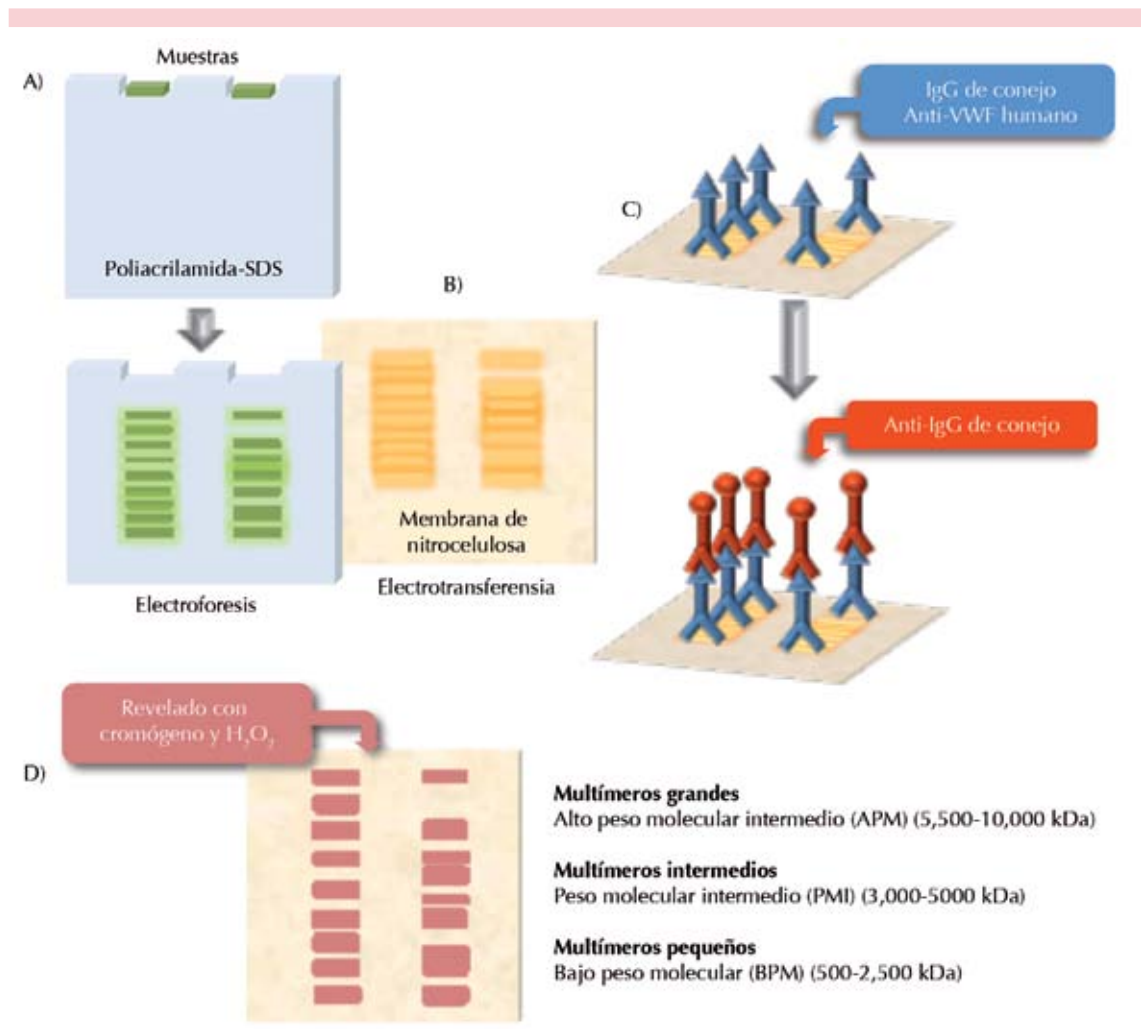


Figura 1. Esquema general de la técnica SDS-PAGE para análisis de los multímeros del factor von Willebrand. A) Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. B) Electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa. C) Unión con inmunoglobulina de conejo anti-VWF humano y con anti IgG de conejo. D) Revelado e interpretación de los multímeros.



Factores que modifican las concentraciones del factor de von Willebrand

En respuesta a estímulos fisiológicos y farmacológicos tales como la trombina, la fuerza de cizallamiento (shear stress) o la desmopresina, entre otros,¹⁸ se libera el factor de von Willebrand de sus sitios de almacenamiento en la célula donde se sintetiza; los multímeros extremadamente grandes de alto peso molecular se unen a la superficie de la célula endotelial a través de la interacción con la proteína P selectina de los cuerpos de Weibel-Palade. El factor de von Willebrand interviene en la hemostasia primaria y secundaria, uniéndose con diversos receptores de las células sanguíneas, mediando la adhesión de las plaquetas a la pared vascular dañada y participando en la agregación plaquetaria como acarreador y protector del FVIII:C.¹⁹

Los factores que pueden alterar las concentraciones del factor de von Willebrand son: raza, edad, grupo sanguíneo ABO, epinefrina, mediadores inflamatorios y hormonas endocrinas, particularmente las vinculadas con el ciclo menstrual y el embarazo, durante el cual se incrementan (dos a cinco veces). Los africanos y afroamericanos tienen en promedio concentraciones más altas que la población caucásica. Las diferencias étnicas parecen de mayor importancia que el grupo ABO; la raza afroamericana tiene concentraciones más elevadas del FvW:Ag, pero no del FvW:RCo. El ejercicio físico moderado o extremo en personas sin enfermedad de von Willebrand conlleva un rápido y significativo aumento de las fracciones de FvW:Ag y FVIII:C. Después del ejercicio extremo, el reposo de 15 a 30 minutos no es suficiente para realizar la prueba, por tanto, se recomienda diferir el estudio.²⁰

Los defectos cuantitativos o cualitativos del factor de von Willebrand pueden afectar simultáneamente a varios factores sanguíneos, lo que origina los diferentes tipos y subtipos del padecimiento.²¹ En 2006, la Sociedad Internacional de Trombosis y

Hemostasia (International Society of Thrombosis and Haemostasis, ISTH) publicó las últimas recomendaciones respecto a la clasificación de la enfermedad.⁷ Una característica del factor de von Willebrand es su capacidad para formar “redes” por medio de agregados o multímeros; para clasificar los tipos y subtipos de la enfermedad de von Willebrand, se representa la distribución normal de los multímeros que comprende a los multímeros de bajo, intermedio y alto peso molecular.^{5,15,22}

Las coagulopatías más frecuentes son la hemofilia A y B, y la enfermedad de von Willebrand. La prevalencia de esta última varía según la población estudiada, aunque se ha reportado que es mayor de 1%.²³ En México no hay registros epidemiológicos del padecimiento, sólo se han efectuado algunos estudios aislados desde el punto de vista clínico y hematológico. En uno de ellos se describieron 34 casos en 28 familias, incluso tres con nuevas mutaciones relacionadas,^{15,24,25} y recientemente Majluf Cruz y colaboradores¹⁶ publicaron un estudio piloto de 133 pacientes con sospecha de enfermedad de von Willebrand.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo efectuado en 155 mexicanos mestizos, 75 con diagnóstico presuntivo de enfermedad de von Willebrand, 15 con sospecha diagnóstica de hemofilia A y 65 donadores sanos (testigos) provenientes del servicio de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional (CMN), La Raza, del Hospital General, de México Eduardo Liceaga del Hospital Infantil de México Federico Gómez y de la Clínica de Hemofilia del Banco Central de Sangre del CMN Siglo XXI. Los sujetos se evaluaron y refirieron de acuerdo con la exploración física y la historia familiar. Para las decisiones clínicas se tomaron en cuenta las recomendaciones contenidas en la guía de práctica clínica *Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de von Willebrand*, México, Secretaría de Salud, 2010.²⁶

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital General de México. Los sujetos sanos se seleccionaron bajo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, que rige los bancos de sangre.

Todos los participantes respondieron un cuestionario para determinar las diferentes variables y firmaron una carta de consentimiento informado. Los procedimientos se realizaron de acuerdo con las Normas Éticas del Comité de Investigación de la Regulación en Seres Humanos (nacionales e institucionales), sobre la base de la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 2013.

Se efectuaron pruebas básicas o de escrutinio como: tiempo de sangrado, función plaquetaria, tiempo de protombina, tiempo de tromboplastina, tiempo de tromboplastina parcial activada y cuantificación de fibrinógeno, a partir de muestras de sangre con el anticoagulante citrato de sodio en un coagulómetro automático ACL ELITE PRO (Automated Coagulation Laboratory, IL Diagnostics).²⁷⁻³⁰

Pruebas especiales

La actividad del factor VIII coagulante (FVIII:C) se midió utilizando un ensayo de una etapa en un analizador ACL ELITE PRO.³¹ Se determinó el factor de von Willebrand antigénico (FvW:Ag) y después la actividad del cofactor de ristocetina del factor de von Willebrand (FvW:RCo), de acuerdo con el procedimiento indicado por el fabricante.^{32,33}

Prueba de clasificación

El análisis de la composición multimérica del factor de von Willebrand se hizo por SDS-PAGE. Las muestras de plasma a estudiar se tratan con SDS,² se separan electroforéticamente en poliacrilamida; después se electrotransfieren a membranas de nitrocelulosa y se unen con inmunoglobulina de conejo anti- factor de von Willebrand humano

(Dako, Carpinteria, California). Tras varios lavados, se incuba con conjugado de cabra anti IgG de conejo (Dako, Carpinteria, California). Finalmente, se revela. La prueba se llevó a cabo según la descripción de Budde y colaboradores.^{2,7,21,34}

RESULTADOS

Se realizó el estudio en los tres grupos: donadores sanos, pacientes con diagnóstico presuntivo de enfermedad de von Willebrand, y con hemofilia A. Las características generales de estos grupos se enlistan en el Cuadro 1.

El Cuadro 2 indica los valores promedio de las pruebas básicas y especiales; los resultados del grupo testigo están dentro de los valores de referencia. En los pacientes presuntivos de hemofilia A, el tiempo de tromboplastina parcial activada está considerablemente prolongado, y la actividad del FVIII:C notablemente disminuida con respecto al grupo testigo y a los valores de referencia. Los pacientes con sospecha de enfermedad de von Willebrand mostraron variaciones en el tiempo de sangrado, tiempo de tromboplastina parcial activada, FVIII:C, FvW:Ag y FvW:RCo.

La agregación plaquetaria y el análisis de los multímeros del factor de von Willebrand en los

Cuadro 1. Características generales de los grupos estudiados

	Donadores sanos	Pacientes con VWD	Pacientes con hemofilia A
Cantidad (n)	65	75	15
Media (Rango de edad en años)	32.75 (18-56)	22.3 (3-63)	14 (9-15)
Niños	0	24	15
Adultos	65	51	0
Mujeres	38	36	0
Hombres	27	39	15

n: número de individuos de estudio o pacientes. VWD: enfermedad de von Willebrand.

Cuadro 2. Valores promedio obtenidos en las pruebas de hemostasia de la población estudiada

	Donadores sanos	Pacientes VWD	Pacientes con hemofilia A	Valores de referencia
BT (min)	2.45	8.05	contraindicado	1.15 a 3.15
APTT (segundos)	29.67	42.15	59.00	27 - 35
PT (segundos)	13.32	13.12	13.80	12 - 18
TT (segundos)	21.92	22.50	21.80	21.8 - 25.7
Fibrinógeno (mg/dl)	278.66	308.99	291.40	200 - 400
FVIII: C (%)	87.9	45.75	17.50	> 65
VWF: Ag (%)	92.5	53.42	107.00	> 70
VWF: RCo (%)	106.3	29.53	106.40	84 - 112

BT: tiempo de sangrado; APTT: tromboplastina parcial activada; PT: tiempo de protrombina; TT: tiempo de trombina; FVIII:C: actividad del factor VIII coagulante; VWF:Ag: factor de von Willebrand (VWF) antigénico; VWF:RCo: actividad del cofactor de ristocetina del VWF; VWD: enfermedad de von Willebrand.

pacientes con diagnóstico clínico de hemofilia A fueron iguales a los de los testigos sanos; sin embargo, es importante mencionar que clínicamente manifestaban síntomas hemorrágicos. En la Figura 2 se muestran algunos corrimientos electroforéticos del VWF en pacientes con sospecha de enfermedad de von Willebrand. El Cuadro 3 es un resumen del diagnóstico integral de los pacientes y testigos, tomando en consideración las manifestaciones clínicas y las pruebas de hemostasia básicas y especiales.

DISCUSIÓN

La enfermedad de von Willebrand debe su nombre a Erick von Willebrand, quien describió un trastorno hemorrágico hereditario con características similares a la hemofilia, por lo que inicialmente se denominó pseudohemofilia.¹ En este estudio se analizaron 15 pacientes con diagnóstico clínico de hemofilia A y 75 con sospecha de enfermedad de von Willebrand de acuerdo con la historia clínica, los síntomas y las pruebas de laboratorio de evaluación de la hemostasia primaria y secundaria. La correlación clínica-laboratorio demostró la gran variabilidad de este padecimiento. Se ha mencionado que en casos en los que sólo el FVIII es anormal, la enfermedad de von Willebrand puede confundirse con hemofilia

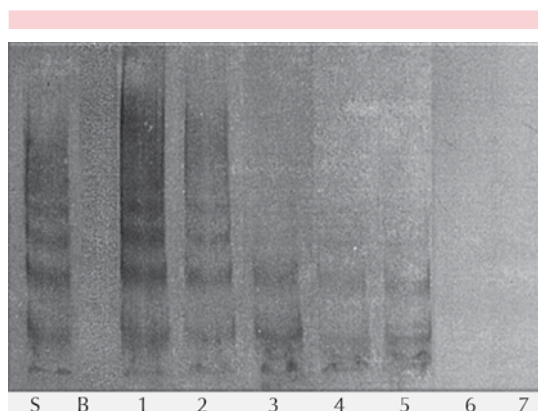


Figura 2. Análisis de multímeros de factor von Willebrand en pacientes con sospecha de enfermedad de von Willebrand. S: Sano. B: Blanco. 1 y 2 pacientes con patrón multimérico normal. 3, 4 y 5 pacientes con ausencia de multímeros de alto peso molecular. 6 y 7 pacientes con un patrón con ausencia de bandas o ausencia total de multímeros.

A; y en los casos en los que el tiempo de sangrado es anormal, puede confundirse con alteración plaquetaria.³⁵ En el Cuadro 2 se enlistan los valores promedio de las pruebas básicas y especiales, de pacientes y testigos. En él se observan claramente las diferencias entre los sujetos con hemofilia A y con enfermedad de von Willebrand. Los pacientes hemofílicos mostraron actividad del factor VIII (también llamado factor antihemofílico) muy

Cuadro 3. Características de las diferentes pruebas de los grupos de estudio

Grupo	Pruebas básicas y especiales	Pruebas de clasificación			n
		Análisis de multímeros	RIPA	Subgrupo	
Testigo	N	MN	N	NA	65
Hemofilia A	N	MN	N	NA	15
EvW	APTT↑, FVIII:C↓, VWF:Ag↓, VWF:RCo ↓, los demás normales	Se encontraron disminuidos todos los multímeros	N	VWD 1	31
	FVIII:C↓, VWF:Ag↓↘ y por lo menos 2 de los demás parámetros alterados	Ausencia de multímeros de APM, disminución de los de PMI, disminuidos los de PMI y aumento de los de BPM	N	VWD 2A	7
	APTT↑, PT↑, BT↑, FVIII:C↓, VWF:Ag↓, VWF:RCo↓	Disminución de los multímeros APM	HA	VWD 2B	1
	APTT↑, TS↑, FVIII:C↓, VWF:Ag↓, VWF:RCo↓	MN	N	VWD 2N	3
	APTT↑, BT↑, FVIII:C↓↓, VWF:Ag↓, VWF:RCo↓	Ausencia de todos los multímeros	N	VWD 3	8
Sin clasificación	N	MN	N	ND	25

VWD: enfermedad de von Willebrand. N: normal, ↑: aumentado, ↓: disminuido, ↘: ligeramente disminuido.

HA: hiperagregación, NA: no aplica, ND: no determinado.

MN: multímeros normales, APM: alto peso molecular, PMI: peso molecular intermedio, BPM: bajo peso molecular.

disminuida y tiempo de tromboplastina parcial activada prolongado; todos los demás parámetros estudiados fueron normales, incluido el patrón electroforético de los multímeros del factor de von Willebrand y la agregación plaquetaria inducida por ristocetina (RIPA).

En cuanto a la población que se sospecha padece la enfermedad de von Willebrand, se ha señalado que puede dividirse en variantes debidas a la deficiencia cuantitativa del factor de von Willebrand y en variantes causadas por alteraciones cualitativas. Las alteraciones cuantitativas pueden ser moderadas, como en el tipo 1, o muy evidentes, como en los tipos 2 y 3. En la Figura 2 se observan algunos patrones multiméricos obtenidos en este estudio; las posiciones identificadas como 1 y 2 corresponden a un patrón normal. Las posiciones 3 a 5 incluyen pacientes con enfermedad de von Willebrand sin multímeros de alto peso molecular y que pertenecen al tipo 2. Los números 6 y 7 son

de pacientes con patrón de ausencia de bandas, por lo que representan al tipo 3.

El estudio de los pacientes con sospecha de enfermedad de von Willebrand es complejo y costoso, es por ello que sólo se recomienda realizarlo una vez que las pruebas básicas y la historia clínica lo indican; en este caso, es necesario hacer una evaluación completa que incluya el análisis de la composición multimérica del factor de von Willebrand y la agregación plaquetaria inducida por ristocetina, con el fin de catalogar los tipos y subtipos de la enfermedad. De acuerdo con los resultados, 47 de los 75 pacientes tuvieron un diagnóstico concluyente; esto es, fueron clasificados según el tipo y subtipo correspondiente de enfermedad de von Willebrand. Tres pacientes se diagnosticaron con tipo 2N. En el Cuadro 3 se resumen los resultados de los pacientes de acuerdo con su clasificación por tipo; 31 sujetos tenían enfermedad de von

Willebrand tipo 1 que, como se muestra, fue la más común y se distinguió por la disminución cuantitativa del factor de von Willebrand, el cual funcionalmente es normal. Ésta es la forma de enfermedad de von Willebrand más frecuente en todo el mundo (70%) y coincide con lo observado en los pacientes estudiados, en quienes la incidencia fue de 62%, tomando en cuenta sólo a los diagnosticados con grupo y subgrupo (Figura 3);^{2,36} además, se aproxima a lo reportado por Majluf y colaboradores en otro estudio en pacientes mexicanos.¹⁶

En la enfermedad de von Willebrand tipo 2 hay una alteración del factor de von Willebrand que resulta en la interacción defectuosa entre las plaquetas, dicho factor y la pared endotelial. El tipo 2 incluye cuatro subtipos (2A, 2B, 2M, y 2N) y se manifiesta en 15 a 30% de los casos,^{2,37} lo que concuerda con la cifra de 22% encontrada en este trabajo (suma de los subtipos 2A, 2B y 2N), en tanto que la reportada por Majluf y colaboradores es mucho menor (7.5%).¹⁶ El más común de estos subtipos es el 2A, que se distingue por la ausencia de multímeros de alto peso molecular y la distribución normal o disminuida de los de peso molecular intermedio, como se observó en este estudio. Un detalle distintivo de estos sujetos fue el aparente aumento de los multímeros de bajo peso molecular.

A un paciente se le diagnosticó enfermedad de von Willebrand tipo 2B (2%); los reportes en la bibliografía internacional son de 5.6%,² ya que se distinguió por el aumento en la afinidad del factor de von Willebrand por la glicoproteína Ib de las plaquetas, al igual que otros subtipos; también es muy heterogénea en las concentraciones de FvW:Ag. El patrón multimérico muestra deficiencia de los multímeros de alto peso molecular y algunas veces trombocitopenia. Es importante realizar el análisis de multímeros porque la enfermedad de von Willebrand tipo 2B se confunde en ocasiones con la púrpura trombocitopénica idiopática, actualmente conocida

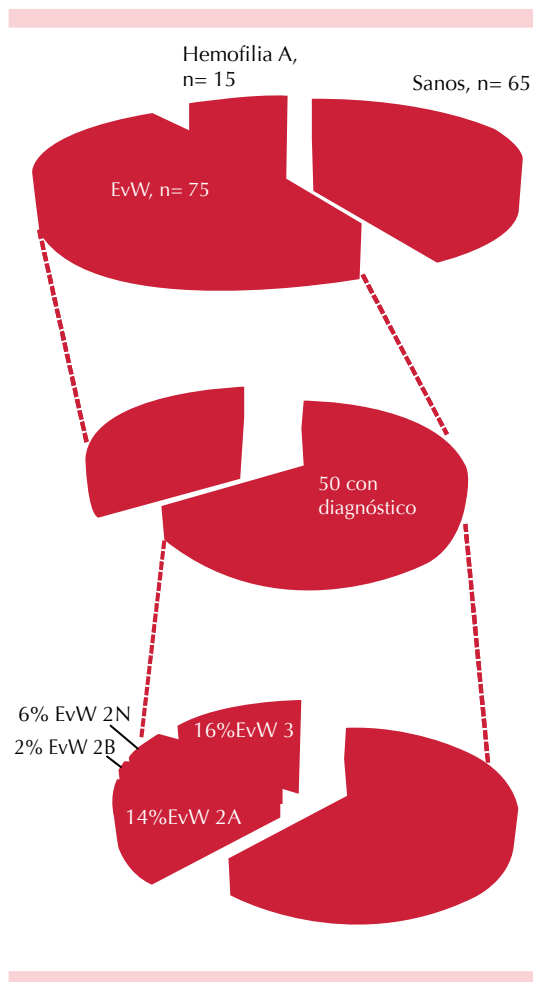


Figura 3. Representación del diagnóstico de los diferentes pacientes de este estudio. Número de individuos en cada uno de los tres grupos de participantes (arriba). Número de pacientes con diagnóstico concluyente de enfermedad de von Willebrand. Pacientes con diagnóstico de enfermedad de von Willebrand y sin diagnóstico concluyente (intermedio). Porcentaje de los diferentes tipos y subtipos de pacientes con enfermedad de von Willebrand de este estudio (abajo).

como trombocitopenia inmunitaria primaria, cuyo análisis electroforético revela un factor de von Willebrand normal.³⁸

A ocho pacientes se les diagnosticó EvW tipo 3, la variedad que originalmente describió Erick von Willebrand (1926), que se distingue por la

ausencia de FvW:Ag circulante y concentraciones disminuidas de FVIII:C, y es la forma más severa de la enfermedad. Estos pacientes tienen predisposición a desarrollar anticuerpos contra la proteína del factor de von Willebrand. En esta variante ocurren más de 80% de las mutaciones descritas en esta proteína, como pequeñas deleciones, inserciones, mutaciones puntuales y mutaciones sin sentido a lo largo de todo el gen, que alteran la estructura y función del factor de von Willebrand.⁴ En todo el mundo, y según lo descrito por Majluf y colaboradores,¹⁶ este tipo de padecimiento afecta generalmente de 1 a 3% de los sujetos con enfermedad de von Willebrand. En este estudio se encontró en 16% de los casos clasificados y, por lo general, se observa en familias en las que existe algún grado de consanguinidad, como en el caso de los pacientes revisados.^{2,16,39}

A los tres sujetos restantes, cuyo análisis de multímeros fue normal, con concentraciones de FVIII:C, VWF:Ag y VWF:RCo bajas, se les diagnosticó enfermedad de von Willebrand tipo 2N,¹⁵ debido a que la hemorragia fue causada principalmente por disminución del FVIII:C, y debe diferenciarse de la hemofilia clásica leve. En estos pacientes, se recomienda complementar con las pruebas de unión del factor de von Willebrand a colágeno (FvW:CB) y afinidad de enlace FvW:FVIII.^{7,40} En todo el mundo, se ha reportado en 3.3%, y en el estudio de Majluf y colaboradores¹⁶ no hubo este subtipo de pacientes.^{2,16}

Finalmente, en los 25 pacientes restantes, los resultados de laboratorio y el análisis de multímeros fueron normales; sin embargo, experimentaron epistaxis, hematomas y sangrado gingival, pese a que no se pudo llegar al diagnóstico concluyente de enfermedad de von Willebrand. Melo y colaboradores²⁵ sugirieron que el diagnóstico genético directo puede ser una opción para las variantes cualitativas de este padecimiento, como en el caso de estos pacientes sin diagnóstico concluyente; mientras que en

las cuantitativas, los estudios de hemostasia e inmunológicos supondrían una alternativa para el diagnóstico de portadores, especialmente en los casos de alta penetrancia.^{15,25}

Hay que considerar que existen mutaciones en los diferentes dominios del factor de von Willebrand, por ejemplo en el exón 28, que codifica para los dominios D3, A1, A2 y A3, en donde se han reportado más de 200 mutaciones vinculadas con la enfermedad de von Willebrand. Es necesario realizar estudios moleculares para conocer las mutaciones existentes, establecer el diagnóstico y asignar el tratamiento adecuado.^{15,16,41}

También es importante hacer el diagnóstico diferencial con otras coagulopatías, como la alteración en los receptores de las plaquetas, que interviene en la adhesión y agregación plaquetaria, y los trastornos en la secreción plaquetaria en la que los pacientes sufren también problemas hemorrágicos.

Para poderlos diferenciar es necesario determinar la densidad de los receptores Gp IIb/IIIa y Ib/IX/V por citometría de flujo, utilizando anticuerpos monoclonales, o en el caso de alteraciones en la secreción por agregación plaquetaria con diferentes agonistas, también es posible ver la disminución de los gránulos por microscopía electrónica.

Con las pruebas aplicadas, incluido el análisis de multímeros, fue posible clasificar a 66.67% de los pacientes de acuerdo con el tipo y subtipo de la enfermedad de von Willebrand. El análisis de multímeros es una prueba para clasificar los tipos 1 y 3, y los subtipos 2A y 2B, como se ha descrito. En México constituye una herramienta importante para el tratamiento de los pacientes; no obstante, es fundamental efectuar pruebas de biología molecular, como PCR en tiempo real o electroforesis capilar, que permitan detectar variantes o alteraciones como: deleciones, mutaciones que llevan a un corrimiento del marco de lectura o sin sentido en los genes relacionados con la enfermedad de



von Willebrand en pacientes sintomáticos que no pueden ser diagnosticados con las pruebas básicas, especiales y de clasificación. Dada la complejidad que implica el estudio completo del gen, es difícil realizar la búsqueda de alguna mutación en particular, por lo que aún no se han integrado las estrategias de biología molecular entre las pruebas de diagnóstico disponibles.

CONCLUSIONES

La enfermedad de von Willebrand es un complejo trastorno de sangrado congénito que se distingue por diferentes defectos cuantitativos y/o cualitativos en el factor de von Willebrand. Su identificación sigue siendo un reto para el médico debido a la variabilidad clínica y de laboratorio. Muchos pacientes son oligosintomáticos y no hay una sola prueba de laboratorio totalmente diagnóstica, por lo tanto, debe utilizarse una combinación de la historia médica del paciente, así como varias pruebas de laboratorio para diagnosticar y definir con precisión la enfermedad. La introducción de técnicas moleculares efectuada en las últimas dos décadas ha incrementado en gran medida la capacidad para caracterizar las variantes genéticas del padecimiento; sin embargo, en contraste, el desarrollo de los métodos para clasificar el fenotipo de la enfermedad ha sido mucho más lento.

En México, existen pocos trabajos relacionados con la enfermedad de von Willebrand, debido a su complejidad, a la dificultad diagnóstica y, como lo indican Majluf y colaboradores,¹⁶ a la poca conciencia de su existencia; es por ello que su prevalencia aún no se ha determinado. El análisis de los multímeros del factor de von Willebrand es un método que cumple con los requerimientos para diagnosticar la enfermedad, el actual “estándar de oro”;²¹ no obstante, es técnicamente exigente y difícil de estandarizar. Si se toma en consideración que aun en los centros de tercer nivel en México los enfermos de von Willebrand no cuentan con un diagnóstico definitivo, se hace

necesario implantar este método para estudiarlo y mejorar su diagnóstico específico.^{15,16}

REFERENCIAS

1. Vischer UM, de Moerloose P. von Willebrand factor: from cell biology to the clinical management of von Willebrand's disease. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999;30(2):93-109.
2. Budde U, Drewke E, Mainusch K, Schneppenheim R. Laboratory Diagnosis of Congenital von Willebrand Disease. *Semin Thromb Hemost* 2002;28(2):173-190.
3. Federici AB. Clinical diagnosis of von Willebrand disease. *Haemophilia* 2004;10(Suppl 4):169-176.
4. Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Worrall NK, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, et al. Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J Biol Chem* 1989;264(33):19514-19527.
5. Schneppenheim R, Budde U. von Willebrand factor: the complex molecular genetics of a multidomain and multifunctional protein. *J Thromb Haemost* 2011;9(Suppl 1):209-215.
6. Triplett DA. Laboratory diagnosis of von Willebrand's disease. *Mayo Clin Proc* 1991;66(8):832-840.
7. Nichols WL, Hultin MB, James AH, Manco-Johnson MJ, Montgomery RR, Ortel TL, et al. von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia* 2008;14(2):171-232.
8. Hoyer LW. Immunologic studies of antihemophilic factor (AHF, factor VIII). IV. Radioimmunoassay of AHF antigen. *J Lab Clin Med* 1972;80(6):822-833.
9. Laurell CB. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal Biochem* 1966;15(1):45-52.
10. Veyradier A, Fressinaud E, Sigaud M, Wolf M, Meyer D. A new automated method for von Willebrand factor antigen measurement using latex particles. *Thromb Haemost* 1999;81(2):320-321.
11. Zimmerman TS, Hoyer LW, Dickson L, Edgington TS. Determination of the von Willebrand's disease antigen (factor VIII-related antigen) in plasma by quantitative immunoelectrophoresis. *J Lab Clin Med* 1975;86(1):152-159.
12. Fass DN, Knutson GJ, Bowie EJ. Porcine Willebrand factor: a population of multimers. *J Lab Clin Med* 1978;91(2):307-320.
13. Tsai HM, Nagel RL, Hatcher VB, Sussman II. Multimeric composition of endothelial cell-derived von Willebrand factor. *Blood* 1989;73(8):2074-2076.
14. Ruggeri ZM, Zimmerman TS. Variant von Willebrand's disease: characterization of two subtypes by analysis of multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor in plasma and platelets. *J Clin Invest* 1980;65(6):1318-1325.
15. Melo-Nava B, Peñaloza R. Molecular biology of von Willebrand disease. *Rev Invest Clin* 2007;59(5):401-408.
16. Majluf-Cruz A, Velez-Ruelas MA, Gonzalez-Avila AI, Garcia-Chávez J, Berges A, Lopez-Santiago N, et al. von

- Willebrand's disease in Mexico: a pilot study. *Haemophilia* 2013;19(2):231-235.
17. Collins CJ, Underdahl JP, Levene RB, Ravera CP, Morin MJ, Dombalagian MJ, et al. Molecular cloning of the human gene for von Willebrand factor and identification of the transcription initiation site. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1987;84(13):4393-4397.
 18. Schneppenheim R. The pathophysiology of von Willebrand disease: therapeutic implications. *Thromb Res* 2011;128(Suppl 1):S3-7.
 19. Reininger AJ. Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis. *Haemophilia* 2008;14(Suppl 5):11-26.
 20. Gonzales JU, Thistlethwaite JR, Thompson BC, Scheuermann BW. Exercise-induced shear stress is associated with changes in plasma von Willebrand factor in older humans. *Eur J Appl Physiol* 2009;106(5):779-784.
 21. Budde U. Diagnosis of von Willebrand disease subtypes: implications for treatment. *Haemophilia* 2008;14 (Suppl 5):27-38.
 22. Gadisseur A, Hermans C, Berneman Z, Schroyens W, Deckmyn H, Michiels JJ. Laboratory diagnosis and molecular classification of von Willebrand disease. *Acta Haematol* 2009;121(2-3):71-84.
 23. Berntorp E, Peake I, Budde U, Laffan M, Montgomery R, Windyga J, et al. von Willebrand's disease: a report from a meeting in the Åland islands. *Haemophilia* 2012;18(Suppl 6):1-13.
 24. Martínez-Murillo C, Quintana González S, Ambriz Fernández R, Domínguez García V, Rodríguez Moyado H, Arias Aranda A, et al. Report of 2 cases with acquired von Willebrand disease and one with acquired hemophilia A. *Rev Invest Clin* 1995;47(3):211-216.
 25. Melo-Nava BM, Benítez H, Palacios JJ, Nieva B, Arenas D, Jaloma-Cruz AR, et al. Molecular study of VWF gene from Mexican Mestizo patients with von Willebrand disease, and the finding of three new mutations. *Blood Cells Mol Dis* 2007;39(3):361-365.
 26. Guía de práctica clínica: Diagnóstico y Tratamiento de la Enfermedad de Von Willebrand, México: Secretaría de Salud, 2010.
 27. Martínez-Murillo C, Quintana-González S, Ambriz-Fernández R, Arzate-Hernández G, Gutiérrez-Romero M, Gaminio-Gómez E. Utility of desmopressin in 4 cases of thrombocytopathies associated with giant platelets. *Rev Invest Clin* 1997;49(4):281-286.
 28. CLSI (antes NCCLS). Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline—Third Edition. NCCLS document H18-A3 (ISBN 1-56238-555-0). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2004;24(38):1-39.
 29. Ríos E, Pinochet M, Mandujano TM. Modified Ivy's bleeding time; normal values in children. *Rev Chil Pediatr* 1982;53(6):552-554.
 30. CLSI (antes NCCLS): One-Stage Prothrombin time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test; Approved Guideline. Document H47-A 1996;28(20):1-17.
 31. CLSI (antes NCCLS). Determination of Factor Coagulant Activities; Approved Guideline. Document H48-A 1997;17(4):1-21.
 32. NCCLS. Assays of von Willebrand Factor Antigen and Ristocetin Cofactor Activity; Approved Guideline. NCCLS document H51-A 2002;22(20):1-19.
 33. Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, "Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos". (Consultado 2014 mayo 19). Disponible en <http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4917/salud3a/salud3a.html>
 34. Mezzano D, Quiroga T, Pereira J. The level of laboratory testing required for diagnosis or exclusion of a platelet function disorder using platelet aggregation and secretion assays. *Semin Thromb Hemost* 2009;35(2):242-254.
 35. Goldin LR, Elston RC, Graham JB, Miller CH. Genetic analysis of von Willebrand's disease in two large pedigrees: a multivariate approach. *Am J Med Genet* 1980;6(4):279-293.
 36. Eikenboom JC, Reitsma PH, van der Velden PA, Briët E. Instability of repeats of the von Willebrand factor gene variable number tandem repeat sequence in intron 40. *Br J Haematol* 1993;84(3):533-535.
 37. Sadler JE, Gralnick HR. Commentary: a new classification for von Willebrand disease. *Blood* 1994;84(3):676-679.
 38. Batlle J, Torea J, Rendal E, Fernández MF. The problem of diagnosing von Willebrand's disease. *J Intern Med Suppl* 1997;740:121-128.
 39. Federici AB, Bucciarelli P, Castaman G, Baronciani L, Canciani MT, Mazzucconi MG, et al. Management of inherited von Willebrand disease in Italy: results from the retrospective study on 1234 patients. *Semin Thromb Hemost* 2011;37(5):511-521.
 40. 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(1):55-62.
 41. Purvis AR, Gross J, Dang LT, Huang RH, Kapadia M, Townsend RR, et al. Two Cys residues essential for von Willebrand factor multimer assembly in the Golgi. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2007;104(40):15647-15652.