

# Antígeno del factor von Willebrand (FVW:Ag)

## von Willebrand factor antigen (VWF:Ag)

Jennifer C. Vizcaíno-Carruyo<sup>1</sup> , María Elena Pérez-Monterrosa<sup>2</sup>,  
Ana Isabel Toro-Montoya<sup>3</sup> , Catalina Franco-Alzate<sup>4</sup> 

### Utilidad clínica de la prueba

El factor von Willebrand (FVW) es una glicoproteína compuesta por multímeros con pesos moleculares que pueden variar desde 500 KDa hasta 20.000 kDa, que se sintetiza en las células endoteliales y en los megacariocitos, y se almacena en los cuerpos de Weibel-Palade y en los gránulos alfa de las plaquetas [1]. El papel del FVW en la hemostasia primaria es mediar la adhesión de las plaquetas a los componentes de la matriz extracelular, a través de los complejos glucoproteicos plaquetarios GPIba y  $\alpha IIb3\beta$ ; en la hemostasia secundaria, se asocia con el factor VIII para prevenir su degradación y favorecer la generación de trombina para la formación del trombo final [2].

La utilidad principal de la prueba antígeno del FVW (FVW:Ag) es diagnosticar la enfermedad de von Willebrand (EVW), la cual es un trastorno hemorrágico causado por una reducción o alteración cualitativa del FVW, que puede ser hereditario en la mayoría de los casos, o adquirido cuando es secundario a otras patologías. Desde el punto de vista clínico, se caracteriza principalmente por hemorragias mucosas y cutáneas. Se diferencian varios tipos de EVW: el tipo 1 (el más frecuente ~85 % de los casos), que es un déficit cuantitativo parcial del FVW con transmisión autosómica dominante; el tipo 2 (~25 % de los casos), que se subdivide en 2A, 2B, 2M y 2N, e incluye todas las alteraciones cualitativas relacionadas con la estructura multimérica del FVW que afectan su función, con transmisión auto-

<sup>1</sup> Médica, Especialista en Hematología. Asistente Científica, Editora Médica Colombiana S.A. Medellín, Colombia. E-mail: jvizcaino@edimeco.com.

<sup>2</sup> Bacterióloga y Laboratorista Clínica, Diplomado en Banco de Sangre y Medicina Transfusional. Laboratorio Clínico Hematólogo. Medellín, Colombia.

<sup>3</sup> Bacterióloga y Laboratorista Clínica, MSc en Virología. Directora Científica, Editora Médica Colombiana S.A. Medellín, Colombia.

<sup>4</sup> Médica, Especialista en Patología. Directora Médica, Laboratorio Clínico Hematológico. Medellín, Colombia.

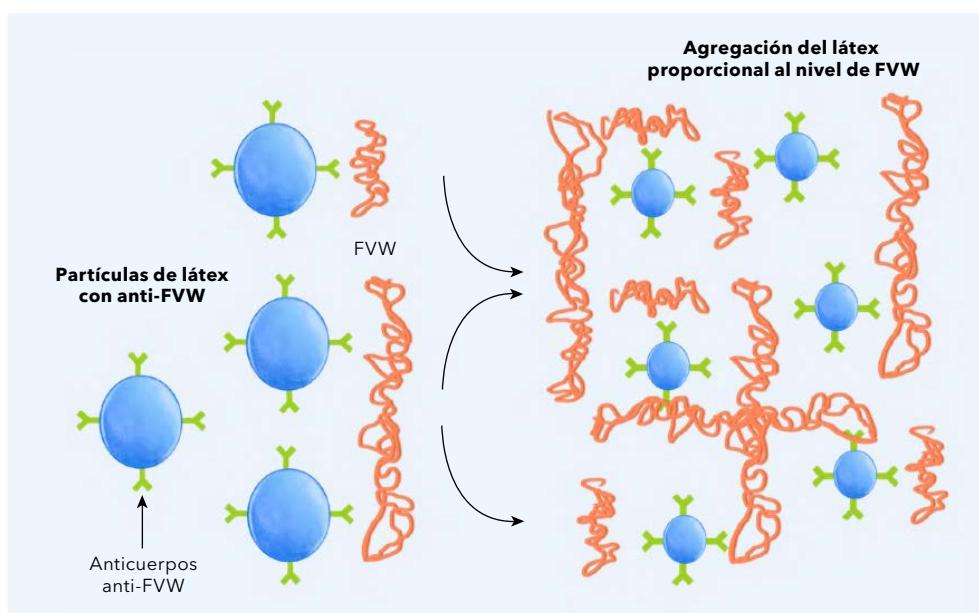
sómica dominante o recesiva; y el tipo 3 (uno por millón de individuos), que se caracteriza por la ausencia casi completa del FVW en el plasma y en los compartimentos celulares, con transmisión autosómica recesiva [3].

Esta prueba también es útil para el diagnóstico de la EVW adquirida, en donde existe un déficit de FVW, pero asociado a diversos estados clínicos como mieloma, linfoma, lupus eritematoso sistémico e hipotiroidismo [4]; también se ha descrito que el grupo sanguíneo influye en los niveles del FVW, observándose una disminución en los sujetos con grupo de sangre O [5]. Por otra parte, existen condiciones donde puede haber un incremento del FVW; por ejemplo, al ser una proteína de inflamación, sus valores aumentan cuando el endotelio vascular está afectado, como en el período posoperatorio, infecciones, cáncer, afección hepática o renal, o puede aumentar en ciertas condiciones

fisiológicas como la edad, el embarazo, el esfuerzo físico, el estrés, y con el uso de la píldora anticonceptiva [5].

## Fundamento de la prueba

La prueba se basa en una técnica de inmunoensayo de látex automatizado (LIA) con un principio inmunoturbidimétrico, donde el aumento de la turbidez de una suspensión de micropartículas de látex es medida por fotometría. Los anticuerpos específicos del FVW que se fijan covalentemente sobre las superficies de las microesferas de látex, se mezclan con el plasma en estudio, provocando una reacción antígeno-anticuerpo con la aglutinación de las microesferas. Esto conduce al aumento de la turbidez de la mezcla y, por lo tanto, a un aumento de la absorbancia del medio. La magnitud de este aumento corresponde a la cantidad del FVW contenido en el plasma de estudio (**figura 1**).



**Figura 1.** Técnica de inmunoensayo de látex automatizado (LIA) para la determinación del antígeno del factor von Willebrand (FVW:Ag).

## Muestra y almacenamiento

Las muestras son plasmas frescos recogidos en anticoagulante de tipo citrato. Para obtener el plasma (pobre en plaquetas), la muestra tomada debe centrifugarse 8 minutos a 3.200 rpm. El plasma se puede conservar 8 horas a  $20 \pm 5^\circ\text{C}$ , 24 horas de  $2^\circ\text{C}$  a  $8^\circ\text{C}$ , y por 1 mes a  $-20^\circ\text{C}$ . Antes de usarlo, si está congelado, se debe colocar a  $37^\circ\text{C}$  durante 5 minutos. No se debe congelar nuevamente.

## Interpretación de los resultados

Los valores de referencia normales del antígeno del FVW (FVW:Ag) en el adulto son de 50 % a 160 %, que son equivalentes a 50 UI/dL y 160 UI/dL, respectivamente; no obstante, cada laboratorio debe establecer su propio intervalo de referencia; además, el resultado debe interpretarse en función del estado clínico y biológico del paciente. Se puede esta-

blecer el diagnóstico de EVW tipo 1 con un nivel de FVW <30% (UI/dL) con o sin manifestaciones hemorrágicas, y si es de 30 % (UI/dL) a 50 % (UI/dL) con sangrado [5]. Por sí sola esta prueba puede confirmar la presencia de la EVW y las variantes 1 y 3, que cursan con déficit cuantitativo, pero se necesita su interpretación en conjunto con otras pruebas para la clasificación de las demás variantes de la EVW [6].

## Limitaciones y ventajas de la prueba

Entre las limitaciones, es posible que se subestime el nivel del FVW:Ag de los plasmas, especialmente en los turbios; en otros casos, como sucede con la presencia del factor reumatoide, se puede sobreestimar el nivel de FVW:Ag. En muchas circunstancias no es posible discriminar los casos de deficiencia severa del FVW (como la tipo 1 con <5 % [UI/dL] o la tipo 3 con <1 % [UI/dL]) [6], o distinguir las variantes inusuales de tipo 2 cuyo nivel de FVW:Ag sea normal.

## Actividad del cofactor de ristocetina (FVW:RCo)

### Ristocetin cofactor activity (VWF:RCo)

## Utilidad clínica de la prueba

La medición de la actividad del FVW es esencial para hacer el diagnóstico y clasificación de la EVW. Tradicionalmente, la actividad del FVW en presencia del cofactor ristocetina (FVW:RCo) se ha considerado el estándar de oro para evaluar la función del FVW dependiente de plaquetas, y fue desarrollada después del descubrimiento de que las plaquetas se agregaban cuando se adicionaba el antibiótico ristocetina [7]. Esta prueba refleja específicamente la capacidad del FVW de interactuar con el receptor plaquetario GPIba en condiciones fisiológicas, las cuales se pueden reproducir *in vitro* con la adición de la ristocetina [6].

## Fundamento de la prueba

La prueba FVW:RCo mide la capacidad del FVW de aglutinar plaquetas exógenas normales fijadas en formaldehído, ante la presencia del cofactor antibiótico ristocetina. La cantidad de aglutinación inducida por la ristocetina está directamente relacionada con la concentración del FVW, y se determina como porcentaje de actividad a través de un agregómetro.

## Muestra y almacenamiento

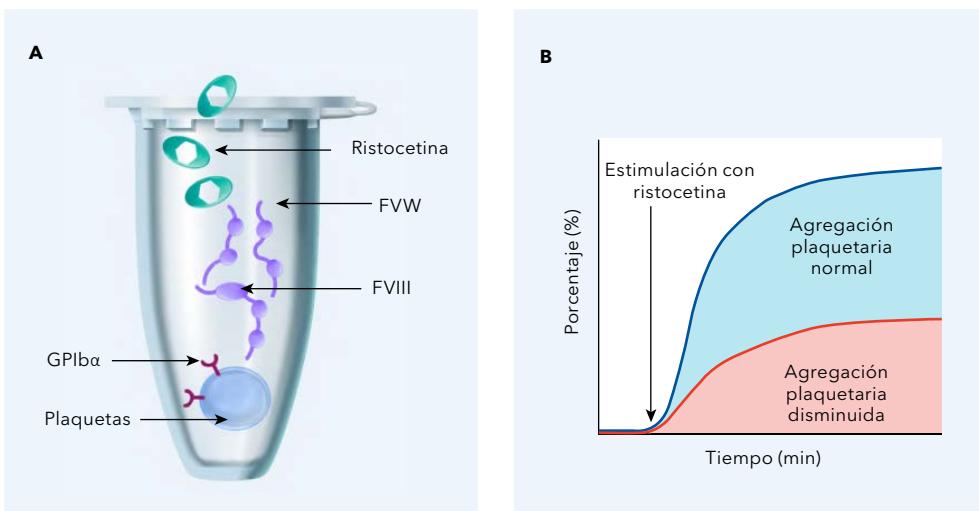
Las muestras son plasmas frescos recogidos en anticoagulante de tipo citrato. Para obtener el plasma (pobre en plaquetas), la muestra tomada debe centrifugarse 8 minutos a 3.200 rpm. El plasma se puede conservar 8 horas a  $20 \pm 5^\circ\text{C}$ , 24 horas de  $2^\circ\text{C}$  a  $8^\circ\text{C}$ , y por 1 mes a  $-20^\circ\text{C}$ . Antes de usarlo, si está congelado, se debe colocar la muestra a  $37^\circ\text{C}$  durante 5 minutos. No se debe congelar nuevamente.

## Procedimiento

Para el procesamiento de la muestra se realizan diluciones en buffer salino 1:2 (50 % actividad) del plasma de control y 1:4 (25 % actividad) del plasma en estudio. Luego, en el agregómetro se hace una lectura de las plaquetas activadas con buffer salino y se incuban por 1 minuto, se adiciona el agonista (ristocetina) y después de 45 segundos se adicionan las diluciones previas. La ristocetina induce la agregación plaquetaria que es proporcional a la cantidad FVW, esta agregación se registra como turbidez en el plasma, y el agregómetro genera una curva de agregación plaquetaria en porcentaje y tiempo (**figura 2**).

## Interpretación de los resultados

Los valores de referencia normales están entre 56 % a 187 %, que son equivalentes a 56 UI/dL y 187 UI/dL, respectivamente; sin embargo, se recomienda que cada laboratorio establezca un va-



**Figura 2.** Agregación plaquetaria inducida por ristocetina. A) Estimulación de la agregación plaquetaria con ristocetina. B) Representación esquemática del resultado. FVW: factor von Willebrand; FVIII: factor VIII.

lor de referencia para su población, sistema de instrumentos y reactivos. Por sí sola esta prueba puede confirmar la presencia de la EVW, pero se debe realizar en conjunto con la del FVW:Ag para calcular el índice entre el FVW:Ag versus FVW:RCo y poder diferenciar los pacientes tipo 1 de los tipo 2. Si el índice es  $>0,7$  se asocia a EVW tipo 1, y si es  $<0,7$  se asocia al tipo 2; así mismo, se necesita su interpretación en conjunto con otras pruebas para la clasificación final de las demás variantes de la EVW tipo 2 [6]. En la **tabla 1** se observa cómo se encuentra esta prueba en los tipos y subtipos de EVW.

## Limitaciones y ventajas de la prueba

Esta prueba evalúa la actividad del FVW dependiente de plaquetas bajo condiciones no fisiológicas, por lo que presenta varias limitaciones, entre ellas, gran variabilidad entre laboratorios y baja sensibilidad cuando hay niveles bajos en plasma de FVW:Ag ( $<10\% \text{ [UI/dL]}$ ), que pueden llevar a un error diagnóstico. Además, falla en diagnosticar la EVW cuando se administran concentrados de factor VIII o 1-deamino-8-D-arginina vasopresina (DDAVP).

**Tabla 1.** Actividad del cofactor de ristocetina en los tipos y subtipos de enfermedad de von Willebrand (EVW)

Prueba	Tipo 1	Subtipo 2A	Subtipo 2B	Subtipo 2M	Subtipo 2N	Tipo 3
FVW:RCo	Baja	Muy baja $<20\% \text{ (UI/dL)}$	Variablemente baja	Baja	Normal o baja	Muy baja $<5\% \text{ (UI/dL)}$

## Multímeros de factor von Willebrand

### von Willebrand factor multimers

## Utilidad clínica de la prueba

El FVW se secreta en la corriente sanguínea como una estructura dimérica o multímera, que se clasifica de acuerdo al peso molecular de sus multímeros en peso molecular bajo (LMW, del inglés, *Low Molecular Weight*), peso molecular intermedio (IMW, del inglés, *Intermediate Molecular Weight*), peso molecular alto (HMW, del inglés, *High Molecular Weight*) y ultra alto (UHMW, del inglés, *Ultra High Molecular Weight*). Los multímeros UHMW no circulan normalmente en el plasma en condiciones fisiológicas, ya que son degradados rápidamente por la proteasa ADMTS13, formando multímeros de diferentes tamaños. Debido a que la actividad hemostática de los multímeros es directamente proporcional a su tamaño, el déficit o la ausencia total de multímeros en la EVW va a producir manifestaciones hemorrágicas en menor o mayor intensidad, dependiendo del tamaño de los multímeros afectados [8]. La prueba de análisis de los multímeros del FVW

por electroforesis es relevante para la clasificación de los subtipos de la EVW, y se usa en conjunto con pruebas como el FVW:Ag, FVW:RCo y actividad del factor VIII (FVIII:C), entre otras. El propósito del correcto diagnóstico y clasificación de los subtipos de la EVW es poder dar, finalmente, un tratamiento adecuado al paciente con EVW.

## Fundamento de la prueba

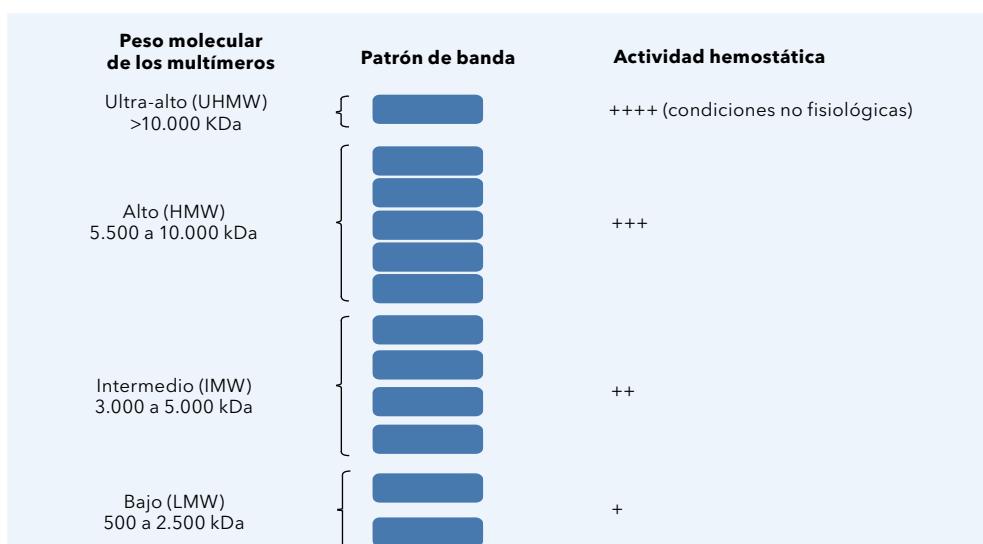
Esta prueba se basa en la técnica de electroforesis e inmunofijación en gel de agarosa, que permite evaluar la distribución y presencia de los multímeros del FVW en el plasma de acuerdo a su peso molecular. En el gel, los multímeros son separados e inmunoprecipitados con un antisuero específico anti-FVW. Por último, la utilización de un anticuerpo marcado con peroxidasa y un substrato específico, hace que se puedan visualizar las diferentes bandas en el gel (**figura 3**).

## Muestra y almacenamiento

Las muestras son plasmas frescos reco- gidos en anticoagulante de tipo citrato. Para obtener el plasma, la muestra toma- da debe centrifugarse 8 minutos a 3.200 rpm, pero este siempre debe congelarse de forma inmediata entre -70 °C a -80 °C, antes de realizarse el análisis de la mues- tra. De esta manera se conserva hasta por un máximo de 18 meses. Para realizar el estudio, la muestra se debe descongelar hasta alcanzar temperatura ambiente. No se deben guardar las muestras ni a temperatura ambiente ni a 2 °C u 8 °C.

## Interpretación de los resultados

En una muestra normal, la electrofore- sis se visualiza como bandas donde se pueden distinguir los multímeros LMW que migran más rápidamente, segui- dos de los IMW, y luego por las bandas de movimiento más lento que son las



**Figura 3.** Distribución de los multímeros del FVW por electroforesis en gel de agarosa, de acuerdo a su peso molecular. La actividad hemostática de los multímeros es directamente proporcional a su tamaño. Tomado y adaptado de [8].

de los multímeros HMW [6]. Los tipos de EVW 1, subtipos 2M y 2N muestran un patrón de electroforesis normal (**figura 4A**), pero con intensidad de las bandas disminuida en el tipo 1. Para la EVW 2A, el patrón muestra una pérdida o disminución de los multímeros IMW y HMW (**figura 4B**), en tanto que los pacientes con EVW tipo 2B se caracterizan por una pérdida o disminución de los multímeros HMW (**figura 4C**). Final-

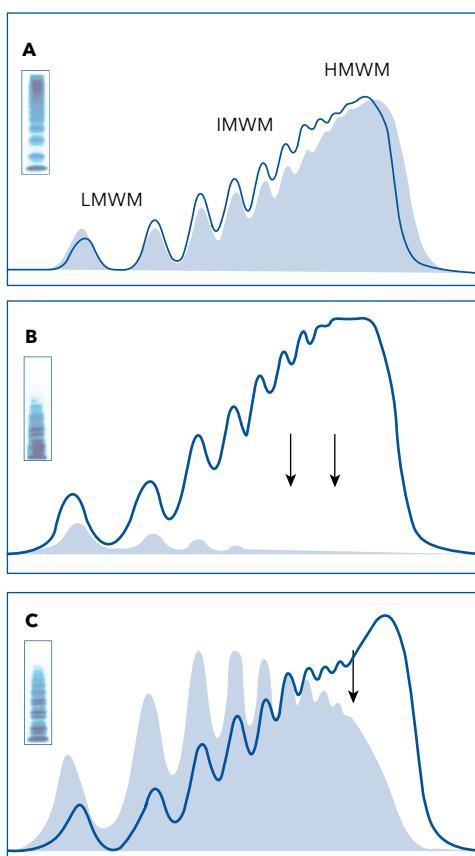
mente, en los pacientes con EVW tipo 3, debido a que tienen ausencia total de multímeros de FVW, no se observan bandas migratorias. Es de importancia mencionar que esta prueba es la que permite distinguir los subtipos 2M y 2A, ya que en el resto de las pruebas para EVW, sus resultados son similares [6].

Se recomienda la interpretación del gel tan pronto como sea posible, ya que la calidad de este se deteriora con el tiempo dependiendo de las condiciones de almacenamiento (luz, calor, etc.). El almacenamiento prolongado de los geles en un lugar seco y lejos de la luz, debe realizarse solo con el propósito de archivar la información.

## Limitaciones

Por lo general, debido a que esta prueba presenta un límite de detección de multímeros cuando la concentración del FVW es baja, es posible que en estos casos, algunos multímeros no sean detectados por este método.

## Referencias



**Figura 4.** Patrones de distribución de los multímeros de FVW por electroforesis. A) Patrón normal; B) patrón con ausencia de multímeros grandes (HMWM) e intermedios (IMWM), correspondiente a la enfermedad de von Willebrand subtipo 2A; C) patrón de electroforesis con pérdida de multímeros de alto peso molecular (HMWM), correspondiente a la subtipo 2B.

1. **Ledford-Kraemer MR.** Analysis of von Willebrand factor structure by multimer analysis. *Am J Hematol* 2010;85:510-514. <https://doi.org/10.1002/ajh.21739>.
2. **Ruggeri ZM.** Von Willebrand factor. *Curr Opin Hematol* 2003;10:142-149. <https://doi.org/10.1097/00062752-200303000-00008>.
3. **Fogarty H, Doherty D, O'Donnell JS.** New developments in von Willebrand disease. *Br J Haematol* 2020;191:329-339. <https://doi.org/10.1111/bjh.16681>.
4. **Franchini M, Mannucci PM.** Acquired von Willebrand syndrome: focused for hematologists. *Haematologica* 2020;105:2032-2037. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.255117>.
5. **Makris M, Hermans C.** The 2021 von Willebrand disease guidelines: Clarity and contro-

- versy. *Haemophilia* 2022;28:1-3. <https://doi.org/10.1111/hae.14465>.
- 6. Baronciani L, Peyvandi F.** How we make an accurate diagnosis of von Willebrand disease. *Thromb Res* 2020;196:579-589. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.07.010>.
- 7. 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;13:1345-1350. <https://doi.org/10.1111/jth.12964>.
- 8. Stockschlaeder M, Schneppenheim R, Budde U.** Update on von Willebrand factor multimers: focus on high-molecular-weight multimers and their role in hemostasis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2014;25:206-216. <https://doi.org/10.1097/mbc.0000000000000065>.