



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

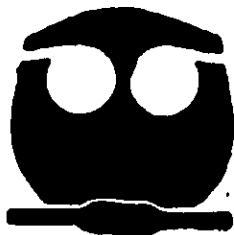
FACULTAD DE QUIMICA

PRUEBAS DE ESCRUTINIO PARA ESTABLECER EL
DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE VON-
WILLEBRAND

INFORME DE LA PRACTICA PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:

ANGEL MARTINEZ ORTIZ



285889



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE
VOCAL
SECRETRARIO
1er SUPLENTE
2º SUPLENTE

PROF. JOSE LUIS DOMINGUEZ TORIX.
PROF. ABEL GUTIERREZ RAMOS.
PROF. ANA ESTHER AGUILAR CARDENAS
PROF. EVA DELIA CALDERON GARCIDUEÑAS
PROF. PATRICIA ELVIRA BERRON RUIZ.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO ESPECIAL DE HEMATOLOGIA
CENTRO MEDICO "LA RAZA" I.M.S.S.
FACULTAD DE QUIMICA U.N.A.M.

ASESOR DEL TEMA:



Q.F.B. ABEL GUTIERREZ RAMOS

SUSTENTANTE



SR. ANGEL MARTINEZ ORTIZ.

AGRADECIMIENTOS:

A mis padres Pedro+ y Paula.

A mi esposa Amalia.

A mis hijas Lorena y María de los Angeles.

A mis hermanos: Nacho, Mario+, Juan, Arturo, Pépe, María, Reyna, Malena, Tere y Tony+.

Por su apoyo y cariño y sobre todo la paciencia que siempre me mostraron y que tanto aprecio porque han sido y serán para mí la luz que guíen mis pasos.

Un especial reconocimiento Al Dr. José Gonzalez Llaven jefe del laboratorio de hematología especial del Hospital de especialidades del centro médico "la raza" y a mis compañeros amigos y asesores de este trabajo Química Aurora Garcia Manzano, Químico Rodolfo Ocadiz quienes son investigadores y especialistas en esta rama de la ciencia y que con su ayuda y atinados consejos y sobre todo el ambiente tan agradable que vivimos durante la realización del presente y finalmente a mi asesor Químico Abel Gutiérrez Ramos.

Hoy pienso en ti
Soy el peor de los mejores
Soy limpieza en la basura
Soy aroma no de flores
Me alimento de amargura
Por lograr la calidad
Soy estrella en la negrura
Sin querer soy de tu edad
Y comparto tu tristeza
Por darte felicidad
El destino cobra siempre
Sin importar la riqueza.

Angel Martínez Ortiz.



CONTENIDO		pagina
CAPITULO	I	GENERALIDADES
1.	Marco histórico	2
2.	Hemostasia y Trombosis	3
3.	Enfermedad de Von Willebrand	4
4.	Biosíntesis del Factor von Willebrand	5
5.	Clasificación de la Enfermedad de Von Willebrand	7
CAPITULO	II	OBJETIVOS
1.	Objetivo	12
	a) propósito	
	b) justificación	
2.	Hipótesis	13
	a) Verdadera.	
	b) Nula	
	c) Planteamiento del problema	
3.	Ruta de trabajo	13
4.	Criterio de inclusión	14
CAPITULO	III	MATERIAL Y METODOS
1.	Métodos de laboratorio	14
2.	Tiempo de sangrado (TS)	
3.	Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa)	15
4.	Determinación del Factor VIII coagulante (FVIIIc)	16
5.	Determinación cuantitativa del Factor von Willebrand	18
6.	Ensayo para el cofactor ristocetina (RiCof)	22
7.	Agregación plaquetaria	23
8.	Ensayo para la detección de multímeros del Factor von Willebrand.	25
9.	Inmunoelctrotransferencia (Western blot)	30
CAPITULO	IV	RESULTADOS
1.	Muestras analizadas	32
2.	Tabla de concentración de resultados	33
3.	Pruebas de laboratorio	
4.	Resultados en imagen de los multímeros del Factor von Willebrand de los Pacientes seleccionados	34
CAPITULO	V	DISCUSION
1.	Estudio comparativo de tres métodos para la visualización de los Multímeros del factor von Willebrand	37
CAPITULO	VI	CONCLUSIONES
1.	Factibilidad beneficio de la Técnica propuesta	38
2.	Análisis de costo y tiempo en el diagnóstico de la Enfermedad Para diagnosticar la enfermedad de von Willebrand	38
CAPITULO	VII	BIBLIOGRAFIA.
		40

CAPITULO I GENERALIDADES

1. - Marco histórico.- En 1926, el Dr. Erick Adolf von Willebrand, describió una alteración congénita de sangrado con el nombre de "pseudohemofilia" la cual posteriormente fue denominada con su nombre y se caracterizó por un tiempo de sangrado prolongado, fragilidad vascular anormal, pero retracción del coagulo normal, los 23 pacientes clínicamente descritos presentaban equimosis fáciles, epistaxis, menorragia y un excesivo sangrado posterior a una extracción dental. En 1933 Von Willebrand y Jurgens revaloraron los mismo pacientes y concluyeron que los sangrados se relacionaban a una disfunción plaquetaria. En 1953, Alexander, Goldstein, Larrieu y Soulier encontraron además deficiencia del factor VIII.C en diversos grupos familiares de ambos sexos, además compararon la respuesta a la transfusión de plasma o derivados en pacientes con E. von Willebrand contra pacientes con hemofilia A, observando marcadas diferencias. Por ejemplo: El empleo de crioprecipitados como tratamiento de elección en un problema hemorrágico corregía la actividad del factor VIII coagulante (FVIII: C) pero no el tiempo de sangrado en la enfermedad de Von Willebrand (evo) y por el contrario en Hemofilia "A" sí se corrige el factor VIII: C y el tiempo de trombina (T.T.) normal.

En 1963 Salzman descubrió un nuevo método para evaluar la función plaquetaria, consistente en valorar la adhesividad de las plaquetas y encontró disfuncionalidades en evo que podían ser corregidas in vivo e in vitro por plasma o fracciones. La investigación de la estructura y función de esta proteína de la coagulación empezó a principios de la década de los setenta con los trabajos de Zimmerman Z.M. y col. (1) Al cuantificarla electroinmudodifusión, utilizando anticuerpos heterólogos. Zimmerman 1979 emplea técnicas más sensibles como la radioinmunolectroforesis simple y cruzada para determinarla. Mientras Howard y Firkin introducían como prueba diagnóstica las plaquetas, en un plasma rico en plaquetas preparado de individuos sanos pero con efecto negativo en pacientes con enfermedad de von Willebrand demostrando así un defecto plasmático relacionando con la disminución o ausencia de la actividad del cofactor ristocetina (VIII:Co).

Meyer y col. En 1980 introducen una técnica de electroforesis en gel de agarosa-SDS seguida de una tinción con un anticuerpo marcado radiativamente (Ruggeri y Zimmerman 1980) revelando existencia de una serie de bandas multiméricas separadas sobre la base de su peso

molecular, descubrimiento que por su importancia sirve como base al desarrollo del presente trabajo.

Usando una traducción completa con beta-mercaptoetanol fue posible observar solamente una subunidad de 200,000 a 230,000 daltons considerada como protómero (Legaz y col. 1973). Varios estudios de la estructura multimérica purificada parecen establecer que el factor VIII vW está construido por subunidades unidas por enlaces disulfuro y esta unión permite que los dímeros juntos sean menos accesibles a los agentes reductores a los multimeros de alto peso molecular (1,500.000 a 2,000.000 daltons) counts y col. 1978. (8).

La determinación de la estructura multimérica ha permitido identificar que la ausencia en cantidad o calidad de los multimeros de mayor, menor, así como los de peso molecular intermedio son responsables de las variantes de dicha enfermedad (Nomenclatura del Comité Internacional de Hemostasia y Trombosis)(.7).

La enfermedad de von Willebrand es una de las más frecuentes manifestaciones asociadas con sangrado que se presentan en el servicio de hematología del Hospital de Especialidades "La Raza" Instituto Mexicano del Seguro Social, la cual hasta esta fecha ha sido caracterizada únicamente con técnicas convencionales: Tiempo de sangrado (T.S) lvi anormal, tiempo de tromboplastina parcial (T.T.P.a) prolongado, Factor VIII coagulante (FVIII: C) disminuido, Factor VIII antigénico (FVIII: Ag.) bajo, (R.cof) y agregación plaquetaria con ristocetina bajo. Por lo que se hace necesario contar con una técnica de laboratorio para el análisis de la estructura multimérica del FvW ya que, es de importancia básica en la diferenciación y clasificación de los diferentes tipos y subtipos de esta enfermedad, siendo esta una información útil para la elección de una terapia apropiada.

2.- Hemostasia y trombosis. - La hemostasia es el proceso fisiológico que detiene la hemorragia espontánea o provocada. Este término tiene varias aplicaciones. Puede detenerse la hemorragia de un gran vaso seccionado mediante hemostasia mecánica y, si el vaso implicado es pequeño por hemostasia espontánea bajada en mecanismos fisiológicos. La hemostasia mecánica se soluciona quirúrgicamente o por primeros auxilios. Los trastornos hemorrágicos surgen por la alteración de la

hemostasia fisiológica y requiere inicialmente la colaboración del laboratorio. Para la corrección de estos trastornos es indispensable valorar inteligentemente los datos del laboratorio y la estrecha colaboración entre el patólogo y el clínico.

La enfermedad tromboembólica es una manifestación de la hemostasia patológica, que consiste en la aparición de un proceso trombótico por alteración de la misma. Es todavía difícil, definir o predecir el "estado de hipercoagulabilidad", entendiéndolo por tal una serie de características de la sangre que la hacen propensa a formar trombos. Además, la aparición de la hemostasia patológica se basa en un estado de hipercoagulabilidad que comienza en la luz de un vaso sanguíneo.

3.- LA ENFERMEDAD VON WILLEBRAND . - El término *evW* se define como una alteración de sangrado la cual es heterogénea en sus modalidades de transmisión genética, clínica, y por mecanismos patogénicos. Común a las diferentes formas de la enfermedad es que todas ellas presentan desórdenes genéticos, transmitidos en forma autosómica, la cual altera la estructura, la función o la concentración del FvW. En la mayoría de los subtipos, las manifestaciones de sangrado aparecen en individuos heterocigotos, pero en otros casos sujetos sólo homocigotos o doble heterocigotos tienen evidencia de la enfermedad. La causa fundamental del sangrado está relacionada a las anomalías de cantidad y/o a la calidad del FvW, y al menos 21 subtipos diferentes han sido descritos basados en las características fenotípicas de la proteína, además, recientemente las técnicas introducidas de análisis genético han identificado heterogeneidad adicional dentro de los subtipos de características fenotípicas similares.

En la actualidad, no existe una clasificación sistemática de la *Evo*, en su lugar, diferentes investigadores independientes han publicado una colección de reportes describiendo pacientes con supuestas características distintivas, definidas por una variedad de técnicas de laboratorio, análisis de la estructura multimérica del FvW constituye las bases de la diferenciación entre los tipos I (todos los multímeros presentes) y el tipo II (multímeros de alto peso molecular ausentes), y diferentes patrones distintivos han sido identificados actualmente entre ambos grupos, sin embargo, incluyen pacientes en quienes las manifestaciones de sangrado son causados por diferentes mecanismos patogénicos. Los pacientes con características similares han sido

reportados independientemente bajo diferentes designaciones, añadiendo confusión a los subtipos ya existentes.

Aunque nos hemos convencido de que una clasificación comprensiva de la Evo debería ser propuesta solamente después de un profundo entendimiento de las alteraciones fisiopatológicas de la estructura, de la función y del control genético del FvW, esto puede tomar años. Hasta entonces puede ser útil organizar la totalidad de conocimientos acumulados hasta la fecha y agrupar a los pacientes en categorías identificadas por parámetros bien definidos así como también por mecanismos patogénicos comunes. Para evitar nuevas confusiones terminológicas, los investigadores han retenido la nomenclatura propuesta originalmente para la descripción de cada nueva forma evo. El intento por racionalizar la clasificación de la Evo es más que un ejercicio ya que puede proporcionar información útil para la elección de la terapia apropiada.

4.- BIOSINTESIS DEL FvW.- La síntesis del FvW se realiza en células endoteliales y megacariocitos (7,8). El gen que codifica para esta proteína está localizado en el cromosoma 12 (2,5). El correspondiente RNAM es de 8.5 a 9 kilobases de longitud y codifica para una proteína constituida por 2,813 residuos de aminoácidos (9). Esta proteína representa al pro-FvW. El producto de la traducción inicial es rápidamente dimerizado en el retículo endoplásmico mediante enlaces disulfuro intercadena, presumiblemente involucrando los extremos carboxilo-terminales de las dos subunidades (10), sufriendo una compleja serie de pasos, incluyendo la remoción de un péptido señal de 22 aminoácidos de longitud (9) así como glicosilación (11). Además, un gran polipéptido, de 741 residuos de aminoácidos de largo, es eliminado del extremo amino-terminal de la pro-subunidad (12), un evento que puede ocurrir después de la dimerización. El pro-polipéptico digerido es secretado como una proteína distinta (12,13) o es localizada en los gránulos de las plaquetas (14) y corresponde al antígeno II von Willebrand descrito previamente (15). Su función en el plasma y como proteína de las plaquetas permanece desconocida. Después de su rompimiento, la subunidad madura, del FvW. Está constituida por 2,050 residuos de aminoácidos. Su secuencia primaria de aminoácidos ha sido también determinada por la degradación de Edman (6).

unión a heparina existe en la región amino terminal de la subunidad constitutiva, dentro de los residuos 1 a 300 (37), y un segundo dominio de unión a colágeno existe en la mitad de la región de la subunidad, dentro de los residuos 911-1, 114 (38, 39). La región amino terminal de la subunidad para el FvW también contiene el sitio al cual el factor VIII procoagulante se une (40). Una representación tentativa de los dominios de unión de la subunidad FvW basado en evidencia experimental.

Se piensa que durante la formación de la monocapa inicial de plaquetas que cubren la superficie endotelial dañada, particularmente en segmentos vascularizados en donde prevalece el daño, involucra una función de formación de puentes del FvW el cual une, por un lado, componentes del subendotelio tales como la colagena y glicosaminoglicanos parecidos a la heparina, por el otro lado a la glicoproteína IB resulta en la activación plaquetaria (41-43) y, con la participación de otros agonistas, esto puede promover el reclutamiento de plaquetas adicionales en el trombo creciente. La unión de fibrinógeno a la glicoproteína IIB-IIIa es de mayor importancia en este aspecto (44), pero el FvW (45), la fibronectina (46) y posiblemente otras proteínas de adhesión pueden participar en el proceso mediante su unión al mismo receptor. El receptor de la glicoproteína IIB/IIIa puede también jugar un papel importante en la formación de la monocapa inicial de plaquetas, pero los ligandos de adhesión involucrados no han sido identificados. La estructura multimérica del FvW está bien adaptada para la multiplicidad de unión y la función de formación de puentes realizadas por la molécula.

La multivalencia de los multímeros más grandes puede resultar en una mayor afinidad de unión para los diferentes sitios de los receptores y explica la gran eficiencia de los multímeros mayores en la hemostasia.

5.-CLASIFICACION DE LA EvW. Sobre la base de las anomalías estructurales y funcionales del FvW. Además de la historia clínica familiar y personal y evaluando el tiempo de sangrado, se deberá evaluar los siguientes parámetros para una definición comprensiva de los pacientes con EvW: actividad del factor VIII procoagulante en plasma; concentración del FvW antigénico, estructura multimérica y actividad del cofactor ristocetina en plasma y plaquetas; y determinar la

dosis de ristocetina necesaria para inducir la agregación en plasma rico en plaquetas (PRP). Además, en casos selectos, los siguientes parámetros deberían ser evaluados: factor VIII procoagulante, concentración antigénica del FvW, estructura multimérica, actividad de cofactor ristocetina en plasma después de una inducción con 1-deamino-8-D-arginina vasopresina (DDAVP), una droga que promueve la liberación del FvW; la estructura multimérica del FvW con diferentes sistemas en gel para detectar anomalías estructurales intrínsecas de multímeros individuales; y una respuesta del plasma rico en plaquetas (PRP) a la botrocetina. Los pacientes con EvW pueden ser agrupados en las siguientes categorías.

Pacientes con anomalías cuantitativas del FvW. Los pacientes con anomalías cuantitativas sin evidencia de anomalías funcionales intrínsecas del FvW, pueden considerarse como la mayoría de los individuos con EvW (=50%), correspondiente al tipo IA y sus subtipos "plaquetas normales" tabla (I-2), "plaquetas bajas" tablas (I-1), I-3, la variante con persistencia de pro-FvW, y la variante con multímeros más grandes que los multímeros normales. La transmisión genética de la enfermedad es con pocas excepciones dominante.

La mayoría de los casos presentan niveles bajos del antígeno del FvW en plasma, usualmente entre el 5 y el 30% del normal, y correspondiendo con niveles bajos de la actividad del cofactor ristocetina (el ensayo refleja la propiedad del FvW de unirse a la glicoproteína 1B permitiendo la aglutinación plaquetaria). El factor VIII procoagulante está también disminuido en la misma proporción del FvW. La patogénesis del sangrado, en estos casos, es debido a los niveles insuficientes de FvW y FVIII circulantes. Las manifestaciones de sangrado son menos severas en aquellos individuos con niveles normales de FvW plaquetario. Estos últimos usualmente tienen una respuesta hemostática excelente al DDAVP; aquellos con concentración baja de FvW plaquetario pueden tener una respuesta pobre.

Pacientes cuyo FvW tiene baja actividad al cofactor ristocetina. Con la posible excepción de los pacientes designados como tipo B, todos los subtipos enlistados en esta categoría exhiben estructura multimérica anormal del FvW con disminución o ausencia de los multímeros mayores. La actividad del cofactor ristocetina es siempre más baja que los niveles del FvW antigénico, el cual

debe estar disminuido o normal. Los niveles del FVIII procoagulante son usualmente proporcional a los niveles de FvW antigénico y puede por lo tanto ser normal o bajo. El grupo incluye grupos IB (plaqueta-discordante), IC, IIA (con sus subtipos IIA-1, IIA-2 y IIA-3), IIC, IID, IIE, IIF, IIG, IIH y tipo B.

La patogénesis del sangrado puede estar relacionada con la ausencia de formas multiméricas grandes de FvW, independientemente de la síntesis anormal. La evidencia del incremento de la proteólisis de los multímeros mayores en algunos pacientes puede ser también el reflejo de anomalías intrínsecas de la actividad molecular del FvW. El sangrado puede ser más severo en pacientes que tienen concentraciones menores tanto del FvW como del FVIII. La respuesta hemostática a la Desmopresina (DDAVP) Es pobre en la mayoría de los pacientes de este grupo, pero puede ser suficiente en algunos individuos con el tipo IB y IIA (probablemente aquellos con una estructura anormal y niveles bajos de FvW plaquetario). Por lo tanto, para minimizar el riesgo potencial de la transmisión de enfermedades severas con productos sanguíneos, el efecto en el tiempo de sangrado debería de ser evaluado en aquellos pacientes con inducción por DDAVP. Esto es razonable también en vista de los mínimos efectos colaterales de esta droga.

Pacientes con una respuesta incrementada a la ristocetina:

En pacientes con respuesta incrementada a la ristocetina los plasmas ricos en plaquetas (PRP) muestran agregaciones a concentraciones de ristocetina más bajas que aquellas necesarias en individuos normales. Este grupo incluye el tipo I-Nueva York (y la variante similar descrita por Holmberg, et al) y el tipo IIB. De interés particular son los pacientes (todos tipo IIB) que manifiestan trombocitopenia transitoria o persistente. Los episodios puede ocurrir con relación no aparente a otros eventos o estar asociada con condiciones tales como estrés, esfuerzo físico o embarazo, los cuales causan niveles incrementados en plasma del FvW. LA trombocitopenia también aparece después de tratamiento con DDAVP (72). Estos pacientes sintetizan una molécula anormal de FvW que, a diferencia de la contraparte normal, es capaz de interactuar directamente con las plaquetas en circulación, probablemente en el sitio IB de la glicoproteína, causando agregación plaquetaria con la consecuente eliminación de la circulación (44). Es aparentemente contradictorio que los pacientes con FvW unen con mayor afinidad la glicoproteína 1B tengan sangrado en lugar de

manifestaciones trombóticas. Se podría interpretar como una evidencia que la secuencia fisiológica de eventos inicialmente involucra la interacción del FvW con el subendotelio y después con las plaquetas. El bloqueo del receptor glicoproteína 1B en las plaquetas circulantes, previene su unión al FvW del subendotelio. La mayoría de los pacientes en este grupo pueden ser identificados como los que se describen para la EvW tipo IIB. Ellos característicamente muestran la ausencia de multímeros grandes del FvW en plasma, probablemente como una consecuencia de su interacción con las plaquetas. Los pacientes con otras variantes de EvW, muestran una respuesta aumentada a la ristocetina pero estructuras multiméricas normales del FvW, no se ha descrito la manifestación de trombocitopenia, ni espontánea ni después del tratamiento con Desmopresina (DDAVP).

Se han descrito otros pacientes que exhiben anomalías estructurales del FvW y respuesta incrementada a la ristocetina, así como episodios de trombocitopenia, similares a la descrita en los pacientes con la EvW tipo IIB, pero ellos representan un grupo distinto en el que poseen anomalías intrínsecas en las plaquetas. En estos casos, las anomalías del FvW son secundarias a la interacción con plaquetas anormales. Estos individuos han sido incluidos en el grupo llamado pseudo-FvW (75) o EvW tipo plaquetaria (76,77) (probablemente la misma enfermedad descrita independientemente por dos laboratorios).

La terapia de los episodios de sangrado en pacientes con EvW tipo IIB está basada en el uso de derivados de sangre (71). La Desmopresina (DDAVP) está contraindicada debido a que causa trombocitopenia o agudiza la trombocitopenia ya existente (72). Probablemente como una consecuencia de la liberación incrementada del FvW anormal, el cual induce agregación plaquetaria. De cualquier manera, la Desmopresina (DDAVP) no parece causar oclusiones vasculares en la microcirculación. La droga no tiene efectos benéficos sobre el tiempo de sangrado en pacientes tipo IIB (78), aunque eleva los niveles del factor VIII y FvW.

En el caso de la EvW pseudo- o tipo plaquetario la aplicación de crioprecipitados, particularmente a dosis altas (79), puede resultar en trombocitopenia. Se cree que este evento es secundario a los niveles incrementados en plasma del FvW que interactúan con plaquetas

anormales de los pacientes (77) y se puede esperar aún después del tratamiento con Desmopresina (DDAVP). Es difícil proporcionar una guía general para valorar el tratamiento de estos casos, aunque parece ser razonable una combinación de concentrado plaquetaria normal y dosis bajas de FvW concentrado en casos de sangrados severos. Además, la respuesta de diferentes pacientes a los niveles aumentados del FvW en plasma varía considerablemente y esto puede afectar a las dosis de concentrado que un paciente puede tolerar, antes de desarrollar trombocitopenia.

Pacientes con EvW tipo III (severa). Pacientes con la forma llamada severa de la EvW (definida por algunos como severa tipo I, o por otros, como tipo III) presentar episodios mayores de sangrado desde edad temprana. Algunos autores la describen como un grupo aparte (y no una severa manifestación de la tipo I) debido a su modalidad típicamente recesiva de transmisión genética y porque en algunas situaciones los escasos niveles de FvW en plasma y plaquetas pueden presentar anomalías estructurales (80). Niños con EvW severa, tienen padres asintomáticos y tienen niveles extremadamente bajos de FvW, usualmente < 1% del normal (80). Como una consecuencia, los niveles del FVIII, la proteína procoagulante, es también muy baja, aunque usualmente cuantificable alrededor del 2 al 10% del normal. Los síntomas similares a las personas que presentan hemofilia, incluyendo hemartrosis y hematoma muscular, no son usuales, y el sangrado de mucosas es muy severo en la mayoría de los pacientes. El tiempo de sangrado es invariablemente muy prolongado.

Las anomalías genéticas responsables de la EvW severa han sido recientemente investigadas utilizando sondas de DNA complementario (DNAC). Estos estudios han conducido a la demostración de deleciones completas o parciales de las regiones traducidas del gen FvW. En algunos pacientes, ambos cromosomas son afectados (pacientes homocigotos); los padres asintomáticos son heterocigotos para la misma deleción (81,82). La síntesis del FvW es completamente suprimida en los pacientes con deleciones homocigóticas y, como consecuencia, desarrollan hetero-anticuerpos después del tratamiento con derivados que contienen el FvW, el

cual en estos individuos, representan un antígeno (83-85). En otros casos han sido demostradas deleciones completas de las regiones traducidas del gen FvW, pero solamente un cromosoma es afectado, de acuerdo a su cuantificación de DNA (82). En estos casos, la enfermedad es probablemente debida a factores hereditarios completamente concomitantes con otros, aún no definidos, además de ser anormalmente heterocigotos. Estos pacientes, por lo tanto son doblemente heterocigotos para dos distintas anomalidades, y sus padres son heterocigotos para dos distintas anomalidades, y sus padres son heterocigotos para cada uno de ellos. Un tercer grupo de pacientes muestra alteraciones no detectables del gen que codifica para el FvW, al menos demostrado con sondas de DNAC, y ahora es posible establecer si ellos son homocigotos o doble heterocigotos (81,82). La presencia de anticuerpos contra FvW es rara en estos dos últimos grupos de pacientes.

El tratamiento de pacientes con EvW severa requiera de la infusión de suficiente cantidad de hemoderivados que contengan FVIII procoagulante activo y al FvW funcional. La misma debe aplicarse antes de cualquier intervención quirúrgica. El tratamiento con Desmopresina (DDVAP) no es útil en estos individuos debido a que las células endoteliales de los pacientes no pueden sintetizar cantidades significativas del FvW.

CAPITULO II OBJETIVOS

Establecer criterios para el diagnóstico y clasificación de la Enfermedad de von Willebrand en el laboratorio de Hematología Especial del Hospital de Especialidades de la "Raza" del Instituto Mexicano del Seguro Social I. M S.S.

1.- Propósito, estandarizar una técnica factible y con alto grado de confiabilidad originalmente propuesta para trabajos de investigación y que pueda estar al alcance de un laboratorio de hematología de referencia para el estudio de esta enfermedad.

Determinando que subtipo es el más frecuente (porcentaje) en la población tratada en el Servicio de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico "La Raza" del Instituto Mexicano del Seguro Social.

2.- Justificación, dadas las características tan especiales de la EvW, y debido al incremento de casos como se observa en la figura en un estudio comprendido de 1990-1993 caso se duplicó el

número de casos presuntivos que se han descrito en instituciones de nuestro país. El jefe de laboratorio de hematología especial del hospital de especialidades "La Raza" del IMSS, Dr. José Gonzalez Llaven propone:

- a) Establecer las condiciones ideales para el análisis multimérico del FvW utilizando una técnica inmunoenzimática.
- b) Determinar los patrones electroforéticos del FvW, obtenido de donadores voluntarios sanos.
- c) Analizar algunas muestras de pacientes con diagnóstico de enfermedad de von Willebrand.

3.- Hipótesis.

a) Verdadera las anomalías tanto en calidad como en cantidad de la composición multimérica estructural sugiere la presencia de una serie de tipos y subtipos que pueden ser caracterizados y tienen relación con las diferentes alteraciones fisiopatológicas.

Se establecieron las condiciones necesarias para llevar a cabo el análisis multimérico del factor von Willebrand.

Se detectaron los patrones electroforéticos del FvW en muestras obtenidas tanto de pacientes como donadores mexicanos. Estos patrones presentaron diferencias en el corrimiento entre las muestras con alteraciones y muestras normales.

b) Nula La técnica propuesta para el esclarecimiento de la composición multimérica de la proteína relacionada con el FvW no es la adecuada ya que no da solución al problema que se plantea.

4. - Planteamiento del problema.- Para poder identificar y clasificar a las bandas multiméricas que conforman la proteína del FvW, es necesario implementar una técnica que complemente los ya existentes y que tienden a aumentar la precisión del diagnóstico y la respuesta que se espera tras una buena elección terapéutica.

5. - Ruta de trabajo a 30 sujetos sanos y a 30 pacientes con diagnóstico de FvW que llenen los criterios de inclusión se les tomarán muestras de sangre para determinarse: Actividad del Cofactor Ristocetina, Factor VIII: Ag., Factor VIII: C, Agregación plaquetaria y Multiméritos del factor von Willebrand; además se les determinará su tiempo de sangrado de Ivy.

6. - Criterio de inclusión Personas seleccionadas por el servicio de Aféresis como posibles donadores de plaquetas señalándose un mínimo de 200,000 plaquetas por centímetro cúbico y no haber tomado ácido acetil salicílico en los últimos cinco días si la toma es crónica, o en los últimos tres días si la toma es única, y otros requisitos que de manera general exige la SECRETARÍA DE SALUD para la disposición de sangre humana y sus componente con fines terapéuticos, publicada en el DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACION del 24 de junio de 1993.

CAPITULO III MATERIAL Y METODOS

1. Métodos de laboratorio. Previamente los pacientes fueron evaluados clínicamente y por el laboratorio con las siguientes pruebas: Tiempo de sangrado de Ivy, Técnica directa para cuenta de plaquetas (Breckner y Cronkite); Tiempo de tromboplastina Parcial Activada (TTPa) (Proctor, Rappaport); Determinación de la actividad de Factor VIII: C; Ensayo para la determinación de la actividad del cofactor Ristocetina; Agregación Plaquetaria (2,3,4,5,6).

2. Tiempo de sangrado. El tiempo de sangrado es una prueba de escrutinio que sirve para evaluar la función plaquetaria y es de utilidad en el estudio cualitativo y cuantitativo de desórdenes adquiridos o congénitos de la función plaquetaria. Generalmente cuando la cuenta de plaquetas se encuentra por debajo de $50,000 /\text{mm}^3$ se obtiene un tiempo de sangrado prolongado. La ingestión de drogas incluyendo aspirina, antihistaminicos o compuestos que contengan aspirina también prolongan el tiempo de sangrado.

a) Método de Ivy modificado por mielke y colaboradores.

Material:

esfigmomanómetro

Cronómetro

Bisturí

Papel filtro

Técnica:

Se coloca el esfigmomanómetro en el brazo del paciente y se lleva a 40 mm. de Hg. El cual se mantiene constante a lo largo de la prueba, se desinfecta la zona anterior del antebrazo y se busca un área avascular, se efectúa un corte de 10 mm. de largo por 0.5 mm. de profundidad. A 5 cm. de distancia del primer corte se hace un segundo corte de iguales características y se absorbe la sangre con un papel filtro cuidando de no rozar las heridas. La absorción de sangre se hace cada 30 ser. Terminada la prueba se coloca una cinta adhesiva para frotar los bordes de ambas heridas.

VALOR NORMAL: de 2 a 7 minutos.

CONSIDERACIONES E INTERPRETACION

La hoja del bisturí debe ser estéril y afilada, la variación en resultados depende de las dimensiones establecidas.

Un tiempo de sangrado (TS) no excluye la propensión sangrar, por lo cual se puede repetir la prueba en otro lugar del cuerpo. Así mismo un tiempo de sangrado (TS) prolongado no prueba la existencia de un trastorno hemorrágico, se puede haber lesionado un vaso grande.

Generalmente existe relación entre el número de plaquetas y el tiempo de sangrado. Pacientes con menos de $50,000 \text{ mm}^3$ tienen tiempo de sangrado (TS) prolongados.

La enfermedad de Von Willebrand, la trombocitopenia adquirida o hereditaria y la trombocitopatía hemorrágica con cifras de plaquetas normales cursan con tiempos de sangrado (TS) prolongados.

LA indicación de que ésta prueba ha sido bien realizada es que la diferencia obtenida entre los tiempos debe ser mínima.

3. - Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa)

(PROCTOR, RAPAPORTT)

El tiempo de tromboplastina parcial activada refleja la integridad global del sistema intrínseco de la coagulación es sensible a los defectos cuantitativos y cualitativos de los factores de contacto (XII-XI precalicreinas kininógeno de alto peso molecular), como también de sus

inhibidores. El fundamento de esta prueba es la obtención de un tiempo de coagulación de un plasma (pool o problema) pobre en plaquetas, al cual se le ha adicionado una tromboplastina parcial (fosfolípidos), un activador de la fase de contacto y calcio par activar dicha vía.

EQUIPO Y REACTIVOS

- Baño María a 37° C fibrómetro – Fibrintimer – Option
- Baño de hielo/agua
- Tubos de vidrio 12 x 75 mm
- Lámpara de iluminación
- Cronómetro
- Pipetas graduadas para 0.1 ml
- Citrato de sodio al 3.8%
- Mezclas de plasma normales citratos (obtenidos en Banco de Sangre)
- Tromboplastina parcial (Cefalina)
- Cloruro de calcio 0.25 M. Caolín, Celite o Ac. Elágico

Las pruebas para cada plasma se efectúan por duplicado, no deben existir diferencias entre los tiempos mayores de 2 segundos, cuando esto sucede repetirá la prueba. Los tiempos prolongados pueden deberse principalmente a la deficiencia de 1 o varios factores de la coagulación o a la presencia de in inhibidor circulante. Para diferenciarlos se repite la prueba con una mezcla de plasma problema y plasma normal en una porción de 1:2, 1:4. Si el tiempo se acorta se debe a una deficiencia de uno o alguno de los factores, en caso contrario supone la presencia de un inhibidor.

4. Determinación del factor VIII coagulante (método de una etapa)

Principio:

Esta técnica se fundamenta al igual que lo referido a otros factores de primera fase en la determinación del tiempo de tromboplastina parcial actividad de una mezcla de 1:1 de un plasma problema diluido en diluciones crecientes y un plasma deficiente del Factor VIII: C (éste último aporta todos los demás factores menos el que se va a evaluar) el tiempo de coagulación de este sistema es inversamente proporcional a la actividad coagulante del FVIII presente en el plasma en estudio.

El porcentaje de actividad se determina por el tiempo de coagulación obtenido en segundos, el cual se interpola en una curva de calibración hecha a partir de diluciones recientes (1:5, 1:10, 1:40, 1:80, 1:160) de una mezcla de plasmas normales a las cuales se les determina su actividad de FVIII: C de la misma manera que el problema.

MATERIAL**REACTIVOS**

1. Plasma deficiente de factor VIII
2. Reactivo para determinar TTPa
3. Cloruro de Calcio 0.025M
4. Buffer de Owren pH 7.35
5. Plasma problema citratado pobre en plaquetas
6. MPN mezcla de 6 a 10 plasmas normales

Procedimiento:

1. Para la curva patrón se hacen diluciones 1:5, 1:20 y 1:80 a partir de la MPN (pool) con el amortiguador de Owren.

2. Para realizar la determinación se coloca en la cubeta de reacción 0.1 ml de la primera dilución se agrega 0.1 ml del plasma deficiente de factor VIII y se continúa con la técnica para TTPa.

Las determinaciones se realizan por duplicado, considerándose el promedio de los tiempos de coagulación para cada dilución, se aceptan diferencias en los tiempos no mayores de 2 al 5%.

3. Seguir el mecanismo para las demás diluciones tanto de la MPN (pool) como para la de los plasmas problemas que previamente se han diluido 1:5 con el buffer de Owren.
4. Se gráfica la curva patrón en escala doble logarítmica el tiempo de coagulación (segundos) contra actividad del factor VIII de la MPN en las abscisas.
5. Para conocer la actividad de las plasmas problemas se interpolan los segundos obtenidos en la curva patrón.

NOTA

Cuando existen antecedentes de la presencia de inhibidor contra alguno de los factores de la coagulación se puede evidenciar de una forma gruesa diluyendo el plasma problema 1:5, 1:20 y 1:80 con el buffer de Owren, en cada una de ellas se determina el porcentaje de actividad interpolando en la curva de calibración y tomando en cuenta la dilución empleada.

Cuando existe la presencia de un inhibidor el porcentaje de actividad obtenido para las tres diluciones se incrementa a medida que aumenten las diluciones. Si no hay inhibidor el porcentaje de actividad será semejante en cada una de las diluciones.

Valores Normales

De 50 a 150% de actividad

5. Determinación cuantitativa del Factor von Willebrand

procedimiento inmunenzimático para la determinación cuantitativa del factor von Willebrand (FvW) por la técnica del emparejado (ELISA)

MUESTRA.

PLASMA CITRATADO

REACTIVOS.

- REACTIVO 1: Pocillos recubiertos con fragmentos F(AB')₂ anti FvW humano específico de conejo
- REACTIVO 2: Anticuerpos anti-FvW humano de conejo acoplados con peroxidasa
- REACTIVO 3: Ortho-Phenylenediamine (Tabletas de 2 mg) (OPD, 2 HCl)
- REACTIVO 4: Buffer fosfato 10 veces concentrado diluir con agua des-ionizada o bidestilada.
- REACTIVO 5: Solución para lavados 20 veces concentrada diluir con agua des-ionizada o bidestilada.
- REACTIVO 6: Plasma humano liofilizado conteniendo niveles de FvW del 100% después de la reconstitución y dilución. Esta referencia de FvW ha sido estandarizada contra un estándar internacional secundario para el FvW establecido en 1988.

REACTIVOS VARIOS:

- Ácido sulfúrico 3M o ácido clorhídrico 1M
- Peróxido de hidrógeno. 30% (aprox. 110 vol.) o 7% (aprox. 30 vol.)
- Pipeta multicanal
- Lector de placas a 492 nm.

PRINCIPIO:

El soporte plástico recubierto con anticuerpos anti FvW humano (REACTIVO 1) captura el FvW de la muestra. El anticuerpo acoplado con peroxidasa (REACTIVO 2) se une a los sitios

antigénicos restantes formando el "emparedado". La enzima peroxidasa es luego revelada por su actividad en un tiempo predeterminado por su acción sobre el sustrato OPD. 2 HCl (REACTIVO 3) en la presencia de peróxido de hidrógeno. Después de detener la reacción con ácido fuerte, la intensidad de color producida es directamente relacionada con la concentración del FwW inicialmente presente en la muestra de plasma.

a) recolección de la muestra y tratamiento

- Se recolecta sangre (9 vol.) en anticoagulante de citrato sódico 0.109 M (3.2%) (1 vol.)
- Centrifugación: 10 minutos a 2,500 g
- Almacenamiento: 8 horas a -20° C

1 mes a -20° C, el plasma debe ser descongelado directamente a 37° C por lo menos durante 15 minutos antes de la prueba.

PROCEDIMIENTO:

PREPARACIÓN DE CALIBRACIÓN Y MUESTRAS.

Utilizar el reactivo 4 para preparar una dilución 1:51 tanto del control (REACTIVO 6) como de la muestra para obtener la dilución de trabajo (p.ej. 50 ul de plasma o control + 2.5 ml de reactivo 4):

CALIBRADORES:

La dilución de trabajo contiene el nivel más alto el cual corresponde al valor establecido (p.ej. 100%). Utilice el REACTIVO 4 para preparar los otros calibradores:

DILUCION	NINGUNA	1:2	1:4	1:8	1:16
NIVEL DE fww	1.2	1.4	1.8	T.8	
% FwW	100	50	25	12.5	6.25

ENSAYO:

Retirar las tiras de pocillos de su empaque justo antes de iniciar el ensayo

Utilizar las diluciones de las muestras inmediatamente después de su preparación.

PIPETEAR EN CADA POCILLO

INMOVILIZACIÓN
DEL ANTIGENO

MUESTRA _____ 200 ul
Cubrir los pocillos e incubar durante 2
Horas a T.A.

LAVAR TODOS LOS POCILLOS 5 VECES CON REACTIVO 5: INMEDIATAMENTE:

INVOVILIZACION
DE INMUNOCONJUGADO

REACTIVO 2 200 ul

Cubrir los pocillos e incubar durante 2 horas a T.A.*

LAVAR TODOS LOS POCILLOS 5 VECES CON REACTIVO 5, INMEDIATAMENTE:

DESARROLLO

SUBSTRATO OPD/H2O2
(REACTIVO 3+H2O2)

200 ul

DE

Incubar a temperatura ambiente EXACTAMENTE 3 minutos para COLOR
cada muestra, luego agregar ácido:

ESPERAR 10 MINUTOS LUEGO REALIZAR LA LECTURA A 492 nm
(ESTABLE HASTA POR 2 HORAS)

* T.M. Temperatura ambiente

RESULTADOS.

Graficar en papel LOG-LOG. Niveles de fw se grafican en las abscisas y sus correspondientes valores de absorbancia en las ordenadas. Los valores se leen directamente de la curva de calibración.

VALORES ESPERADOS:

60 % - 150%.

6. - Ensayo para el cofactor VIII Ristocetina. (RiCof)

El factor Von Willebrand circula en el plasma unido no covalentemente al F. VIII: E. El primero se encarga de la interacción plaqueta/vaso y el segundo como cofactor de la coagulación.

La Ristocetina es un antibiótico que produce agregación plaquetaria en presencia de F VIII/vW. La estimación del FVIII: Ag. se utiliza para el diagnóstico de la enfermedad de Von Willebrand, enfermedades con daño vascular endotelial, para determinar el efecto inflamatorio en la hemostasia primaria y para prevenir la tendencia al sangrado antes de una cirugía.

PRINCIPIO:

Se evalúa la aglutinación que provoca un plasma en una determinada dilución a una cantidad fija de plaquetas humanas y Ristocetina. El título se determina en la que se observó mayor aglutinación y se expresa en % multiplicando el título por el límite de sensibilidad del reactivo.

La lectura puede ser visual o con un agregómetro, variando sólo las cantidades de muestra a utilizar y las condiciones de incubación.

EQUIPO Y REACTIVOS:

- Plasma citratado pobre en plaquetas (obtenido en las 4 horas previas o de 3 meses si se mantuvo a -20° C).
- Plasma de referencia.
- Reactivo (Plaquetas – Ristocetina)
- Placa de Lectura (vidrio o cubetas de agregómetro)
- Solución salina
- Agua destilada
- Agitador

- Agregómetro
- Pipetas de precisión
- Baño a 37° C.

VALORES NORMALES.

De 50 a 150% del valor de un plasma normal (100%).

7. Agregación plaquetaria

Las plaquetas participan en la hemostasia primaria formando agregados en el sitio de daño vascular. Los agentes responsables de la agregación plaquetaria son entre otros ADP, colágeno, ristocetina, epinefrina, etc. En algunos pacientes con alteraciones hemorrágicas y en sujetos normales después de la ingestión de algunas drogas la agregación plaquetaria puede estar alterada por uno o más de estos agentes lo que podría ser la causa de un tiempo de sangrado prolongado.

Se registra la luz que deja pasar un plasma rico en plaquetas (PRP) en agitación, comparándolo contra su blanco de plasma pobre en plaquetas (PPP). Cuando se le adiciona un agente agregante la formación de grandes agregados plaquetarios se acompañan de un incremento en su transmitancia, la cual puede usarse como un índice de agregación plaquetaria.

Al iniciar la prueba la aguja del galvanómetro debe llevarse a 0 % de transmisión de luz con el PRP y al 100 con el PPP, se introduce la celdilla que contiene 0.6 ml del PRP y se le adiciona 0.1 y a 100 con el PPP, se introduce la celdilla que contiene 0.6 ml del PRP y se le adiciona 0.1 ml de agente inductor. La agregación se gráfica por un registrador que ésta acoplado al agregómetro. La agregación con la mayoría de los agentes usualmente es menor a 10 minutos y con algunos agentes a concentraciones óptimas puede ocurrir los 2 minutos. Si los pacientes estudiados

presentan anomalidad en su agregación la prueba deberá repetirse a diferentes concentraciones de agente agregante, de acuerdo al que haya resultado anormal.

AGENTES AGREGANTES	CONCENTRACIONES UTILIZADAS
ADP	2.0-4-0-10UM/ml (concentración final)
COLAGENA	0.8-2.0 ug/ml(concentración final)
TROMBINA	0.25-05 U/ml 8Concentración final)
EPINEFRINA	0.01-0.02 mg/ml /Concentración Final)
RISTOCETINA	0.25-1.2 mg ml (Concentración final)
FIBRINOGENO BOVINO	0.3 mg/ml (Concentración Final).

CALCULO DE RESULTADOS:

El grado de agregación ha sido reportado de diversas formas incluyendo el trazo de la curva, la magnitud absoluta del cambio de transmitancia, y el cambio en % de la transmitancia o densidad óptica.

8. Ensayo para la detección de multímeros del factor von Willebrand (FvW)

a) Principio:

La proteína del factor de von Willebrand (FvW) es inicialmente separado en varios multímeros de diferente peso molecular mediante electroforesis en un gel de agarosa- SDS en condiciones no reductoras. Las bandas de la proteína son afectadas utilizando un anticuerpo anti- fvw y visualizadas utilizando una tinción inmunoenzimática con un complejo avidina- biotina peroxidasa comercialmente obtenido.

b) Equipo y Materiales:

	Fabricante Distribuidor	Modelo Cat. No.
1. Agarosa Estándar Low	BIO-RAD	162-0100
2. Fuente de Poder Corriente constante.	BIO-RAD	MOD. 500
3. Cámara de ELECTROFORESIS	BIO- RAD	MINISUB
4. Potenciómetro	FISHER ACCUMET	
1. Agitador Magnético Con temperatura. Cont.	LAB-LINE	
2. Homo	FIGURSA	HV2030
3. Ultracongelador	REVCO	
4. Balanza	SARTORIUS	
5. Tubos 20 x 150 mm		
6. Pipetas serológicas 10 ml		
7. Tubos de polipropileno 12x75 mm.	ELKAY	
8. Termómetro		
9. Barras magnéticas		
10. Bulbo		
11. Micropipetas ajustables.	CLINICA. GILSON	CLINIPETTE
12. Regla		
13. Nivel	BIO-RAD	
14. Papel Filtro Whatman No. 2 FISHER		
15. Tween 20	SIGMA	RP-2287
16. Equipo Vectastain	VECTOR LABS	RPK-4005
17. 4- Cloro 1 Naftol	SIGMA	
18. Anticuerpo Primario dirigido contra el FvW	ATLANTIC ANTIBOIDES	Cat. 80286

19. Filtros de Nitrocelulosa 0.45 u	BRL	Cat. 1051 MM
20. Sistema de electrotransferencia	BIO-RAD	

reactivos:

1. Solución amortiguadora para muestras

10 mM Tris- Cl .1Mm EDTA, pH 8.0 Ureasa 8M. Azul de bromofenol 0.005%, glicerol 10%

0.012 g Tris (Tris Hidroxi-metil- Amino-metano)

0.04 g EDTA disódico

0.2 g SDS (Dodecil- Sulfato de Sodio)

0.005 g azul del Bromofenol

1 ml Glicerol

Disolver el Tris y el EDTA con agua desionizada (H20d).

Ajustar a Ph 8.0 con HCl. Añadir el SDS y el azul del bromofenol.

Finalmente el glicerol, mezclar. Almacenar a 4° C. Durante 3 meses. Redisolver a 37° C. En un baño antes de utilizarse.

c) Gel de empacamiento

d) 0.8% agarosa, 0.125 M Tris, 0.1% SDS. PH 6.8

1.51 g Tris

0.1 g SDS.

Llevar a 100 ml. Con H2O des-ionizada. Ajustar a pH 6.8 con HCl. Transferir a un matraz de ertemeyer de 250 ml y añadir 0.8 g de agarosa.

En un baño con agua hirviendo calentar hasta que la agarosa se funda y la temperatura alcance los 90°C. Usar una barra magnética para asegurarse de una agitación apropiada. Alicuotar en volumen de 5 ml en tubos de 20 x 150 mm, tapar con parafilm, almacenar a 4°C Duración un mes.

e) Gel de corrida:

1.5% agarosa, 0.375 M Tris, 0.1 % SDS. PH 8.8

4.54 g Tris

0.1 g SDS

1.5 g agarosa

Llevar a 100 ml con H₂O. Ajustar el pH con HCl Transferir a un matraz Erlenmeyer y añadir 1.5 de agarosa. Calentar con agitación hasta que la agarosa se funda y alcance una temperatura de 90°C alicuotar en volúmenes de 20 ml en tubos 20 x 150 mm y almacenar a 4 °C. Durante un mes.

El gel de corrida fundido se puede mantener a 70 °C en un horno de temperatura constante, e alicuotas de 13 ml en jeringas. Este procedimiento es útil cuando el número de pruebas requiera la preparación de diversos geles en un lapso relativamente corto (e.g. hasta 3 días es posible mantener las alicuotas en estado líquido y a temperaturas conveniente).

f) Solución amortiguadora para electroforesis

0.05 M Tris. 0.384 Glicina, 0.1% SDS. PH. 8.35.

12.11 g Tris.

57.65 g Glicina

2.08 g SDS

Llevar a 2 litros con H₂O. Ajustar a pH 8.35 con NaOH. Almacenar a 8-10 °C. Hasta que la electroforesis se lleve a cabo. Evite temperaturas menores a los 6°C o el SDS se precipitará.

0.15 M NaCl Llevar a 2 litros con H₂O. Almacenar a temperatura ambiente

g) Solución amortiguadora de transferencia

Tris 25 mM

Glicina 192 mM

Metanol al 20% v/v

Mezclar 3.03 g de Tris, 14.4 g de glicina y 200 ml de metanol en agua desionizada llevar a un litro.

NOTA:

No ajustar el pH con ácido ó base, la solución debe tener un rango de pH de 8.1 a 8.4 dependiendo de la calidad de los reactivos. Si la solución tiene un pH menor a 8.0, es necesario volver a preparar nuevamente la solución de transferencia.

7. TBS

Tris 60 mM

NaCl mM pH 10.3

Pool Normal.

Colectar 9 partes de sangre en 1 parte de citrato de sodio 3.8% con un mínimo de 10 individuos con TP y TTPa normales.

Centrifugar durante 10 minutos a 3000 r.p.m. a 4 °C. Para obtener plasma pobre en plaquetas.

Reunir los plasmas, distribuir en alícuotas de 0.3 ml en tubos de polipropileno.

Almacenar a - 70. °C.

METODO:

1. Preparación del gel:

a) Los geles son preparados utilizando el soporte incluido con la cámara de electroforesis. Sellar los extremos con cinta adhesiva o cinta para cubrir (masking tape). Colocar el peine separador a 2.5 cm de uno de los extremos para formar la división entre el gel de corrida y el gel de empacamiento. Fundir un tubo de agarosa de comida en baño de agua hirviendo hasta llevarlo a 90 °C. o bien utilizar una alícuota que se ha mantenido a 70 °C., vide supra). Utilizando el nivel, asegurándose de que el soporte esté nivelado. Vaciar 12 ml aproximadamente para obtener un gel de 8.5 cm x 10 cm x 1.5 mm de espesor. Permita enfriar y solidificar durante 20 minutos aproximadamente. Tanto la charola como el gel de corrida debe estar a temperatura ambiente antes de vaciar el gel de empacamiento.

b) Fundir un tubo de agarosa de empacamiento en un baño de agua hirviendo o bien alícuotas previamente fundidas, hasta llegar a 90 °C. Colocar el peine formador de pocillos y pipetear en el espacio destinado junto al gel de corrida. Evite la formación de burbujas. Permita solidificar.

Preparación de la muestra:

Se corren 2 controles normales de pool (100% y 10% FwW) y hasta 4 plasmas provenientes de pacientes por gel. Realizar diluciones 1:2 (25 ul de plasma + 25 ul de mezcla de solución para muestra). Excepto para el control de 10 FwW. Se aplican los 50 ul de muestra a cada pocillo, con ayuda de una micropipeta.

Electroforesis:

La electroforesis se lleva a cabo utilizando solución amortiguadora enfriar a 8°C Llenar la cámara de electroforesis con solución fría recién preparada. Colocar el gel sobre la superficie fría con los pozos hacia el cátodo. Agregar solución para electroforesis hasta rebasar la superficie del gel.

Colocar aproximadamente 50 ul de cada muestra en los pocillos. Llevar a cabo la electroforesis a 65 v (voltaje constante) por gel. Durante un tiempo aproximado de 3:30 hs, procurando mantener la cámara en frío. El tiempo de corrida puede variar de un experimento a otro. La electroforesis es terminada cuando el colorante alcanza el extremo opuesto. Este indicador, el cual migra con los multímeros de menor peso molecular, no debe salir del gel.

9. Inmunoelctrotransferencia (Western blot)

- A. Inmediatamente después de la electroforesis, se equilibra el gel de agarosa durante 30 minutos en la solución amortiguadora de transferencia.
- B. Cortar una membrana de nitrocelulosa a las dimensiones del gel. Las membranas de nitrocelulosa deben manejarse con guantes desechables o bien con pinzas planas especiales para filtros. Humedezca la membrana deslizándola en la solución en un ángulo de 45° y permita la total humidificación durante 30 minutos. Evite formación de burbujas.
- C. Sature filtros de papel Watman cortados al tamaño del gel y las fibras incluidas en el sistema de transferencia.
- D. Instale los electrodos en la cámara de transferencia, así como una barra magnética para agitación.
- E. Prepare el sistema de enfriamiento de la cámara.
- F. Prepare el "emparedado" colocando en el cátodo (-) del cassette de transferencia: fibra, filtro de papel Wathman, gel de agarosa, filtro de nitrocelulosa, filtro de papel Wathaman. Fibra. Cerrar el cassette de tal manera que todo el emparedado quede centrado se debe tener cuidado de evitar la formación de burbujas por lo que es necesario humedecer con solución de transferencia en cada paso de la preparación del cassette, así como también se puede utilizar una varilla de vidrio para eliminar las burbujas formadas.
- G. Arme el sistema de transferencia y agregue la solución amortiguadora de las marcas del cassette (fig. 2).
- H. Inicie la transferencia a 100 V durante 1 hora.
- I. Después de la transferencia se saturan los sitios inespecíficos de unión de proteínas en una solución de TBS con Tween 20 a una concentración final del 2% se incuba durante 10 minutos.
- J. Se lava la membrana de nitrocelulosa en TBS durante 2 minutos.

- K. Se incuba toda la noche con el anticuerpo primario diluido 1:500 en 0.5% de Tween 20 en TBS. 850 ml de TBS + 25 ul de Tween + 100 ul de anticuerpos primario, anti FVIII de cabra).
- L. Se lava 3 veces, 5 minutos por vez utilizando TBS nuevo en cada lavado.
- M. M. Se incuba la membrana durante 3 horas en una solución de TBS con 0.5% de Tween y con anticuerpo secundario diluido 1:1000.
- N. . Durante la incubación con anticuerpo secundario. 30 minutos antes del tiempo indicado, se prepara el complejo adivina- peroxidasa, agregando una gota de reactivo A del equipo Vectastain y una gota del reactivo B en 20 ml de TBS. Dejando la solución 30 minutos a temperatura ambiente.

Terminada la incubación con el segundo anticuerpo, se lava 3 veces, 5 minutos cada vez con TBS nuevo.

- P. Lavar dos veces. 5 minutos por vez con TBS.
- Q. Desarrollar color por reacción de la peroxidasa con + cloro 1- naftol (80 mg de cloronafol en 10 ml de metanol: aparte se preparan 50 ml de TBS con 100 ul de H2O2. Se mezclan ambas soluciones, se utiliza inmediatamente). Aproximadamente a los 10 minutos se hacen visibles las bandas del patrón multimérico
- R. Fotografía.
- S. Análisis de resultados.

NOTAS

- a. Utilice solamente H₂O estéril cuando haga las soluciones.
H₂O desionizada puede contener inhibidores de la reacción peroxidasa.
- b. Las soluciones que contiene azida de sodio u otros inhibidores de la actividad de la peroxidasa no deberá ser usados.

- c. El control pool normal al 10% es para asegurarse que las condiciones de incubación, exposición y revelado son las necesarias para detectar niveles extremadamente bajos de antígeno en la porción de multimeros de alto peso molecular.

Esta detección es requerida para distinguir con precisión entre la enfermedad tipo II y tipo III de von Willebrand

CAPITULO IV RESULTADOS

1. Muestras analizadas. Se analizaron en total 16 muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo de EvW, así como 16 donadores sanos voluntarios de acuerdo a lo descrito en "Materiales y Métodos".

2. pruebas de laboratorio.

Los resultados encontrados en los pacientes con posible EvW que se observan en la tabla siguiente se encontraron tiempos de sangrado prolongados en el 50% de los pacientes. Aquellos que presentaban un tiempo de sangrado mayor a los 10 minutos se consideraron para el estudio. En general se mostraron en los tiempos de tromboplastina parcial activada (TTPa) en segundos dentro de los rangos normales esperados. Las determinaciones de las actividades de FVIII:C y Cofactor VIII: Ristocetina se observan disminuidos con excepción de tres pacientes. En el caso de los estudios de agregación plaquetaria, fueron considerados determinantes para la inclusión de los pacientes con EvW (agregaciones del 16% del Normal o menores utilizando el antibiótico ristocetina como inductor.

3. Tabla de concentración de resultados:

**ESTUDIOS Y ANALISIS MULTIMERICOS PARA 12 PACIENTES
CON DIAGNOSTICO PROBABLE DE EwW**

N°	NOMBRE	T.S./min.	TTPa/s	FVIII:C	RCoF	FvW:Ag	APIR %	EwW	POR
Prog. Paciente								TIPO	IMAGEN
1	R.G. GEORGINA	18	61.9	20	30	16.4	27	I	IA
2	E.M. SOCORRO.	12	51.8	13.5	30	16.2	30	I	IA
3	G.E. IVONNE	9	36.4	42	47	49	19	I	IA
4	G.E.ERIKA	14	38.8	57	33	47	33	I	IA
5	G.C.J.MANUEL	10	67.3	38	20	54.1	66	II	IIB
6	G.M.CARLOS	9	40.7	32	20	38	55	II	IIA
7	G.M.C./24HRS.DDAV	8	43.9	100	20	68	58	II	IIA
8	G.M.R.	10	41.6	29	20	78	39	II	IIA
9	G.B. ROSA MA.	15	34.3	80	120	140	S/D	N	N
10	G.M.R.	10	44.8	46	130	163	81	N	N
11	M.F.FCA.	10	42.5	85	80	93	44	N	N
12	R.A. KARLA	9.5	33.9	46.8	80	76	88	N	N
13	J.R. JAQUELINE	9.5	35.9	73	110	58	94	N	N
%	ALTERACIONES	91	58	66	58	33	75		

ANALISIS MULTIMERICO EN PERSONAS SANAS

14	R. OCADIZ	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	N	N
15	G.E.O.	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	N	N
16	M.L.C.	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	N	N
	POOL DONADORES	3 a 7	32 - 40	100 %	50-100	60 150	100%		
		S/d	Sin datos		N	Normal			

RESULTADOS:

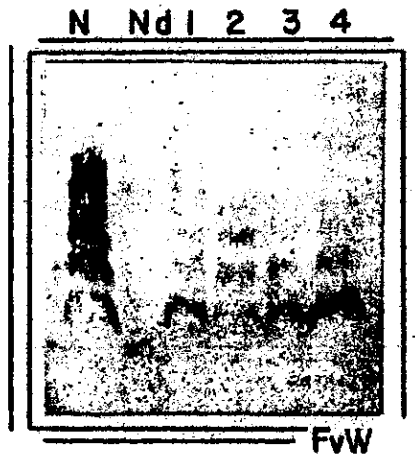
4 PERSONAS PRESENTAROS EwW TIPO IA
1 PERSONA PRESENTA TIPO IB Y 3 IIA
5 PERSONAS NO DIERON RESULTADO POSITIVO PARA SER
CONSIDERADOS COMO EwW.

T.S. TIEMPO DE SANGRADO	En Minutos		
TTPa TIEMPO DE TROMBOPLATINA PARCIAL ACTIVADA.		en	%
FVIII:C FACTOR OCHO COAGULANTE		en	%
RcoF COFACTOR RISTOCETINA		en	%
FvW:Ag FACTOR Von WILLWBRAND ANTIGENICO		en	%
APIR ADHESION PLAQUETARIA POR INDUCCION CON RISTOCETINA			

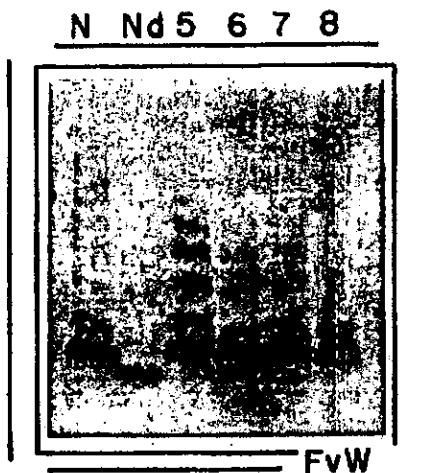
Para este estudio se analizaron muestras de 42 donadores voluntarios para establecer el rango de normalidad en el Laboratorio Especial de Hematología. Se aprecian diferencias mínimas en cuanto a la edad y sexo, observándose una elevación en por ciento hacia 1ª, 4ª, y 5ª. Décadas de vida. También se encuentra un valor mayor en hombres con respecto a mujeres. En comparación con los valores establecidos por la compañía Diagnostica Stago (país) no se encontraron cambios importantes.

4. Resultados en imagen utilizando el Western-blot para los multímeros del Factor von Willebrand de los pacientes seleccionados.

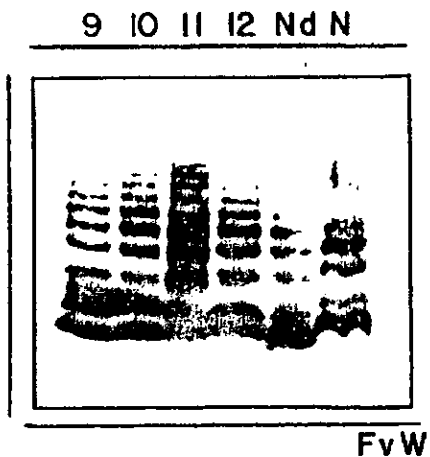
En el caso de los pacientes analizados se encontró que de acuerdo con la imagen multimérica relacionada a los ensayos previos de escrutinio e involución de la enfermedad de vW podemos ver que las muestras 1,2,3 y 4 corresponden con el tipo IA de la enfermedad muestran la misma imagen pero con mayor presencia en cantidad de los multímeros de alto peso molecular.



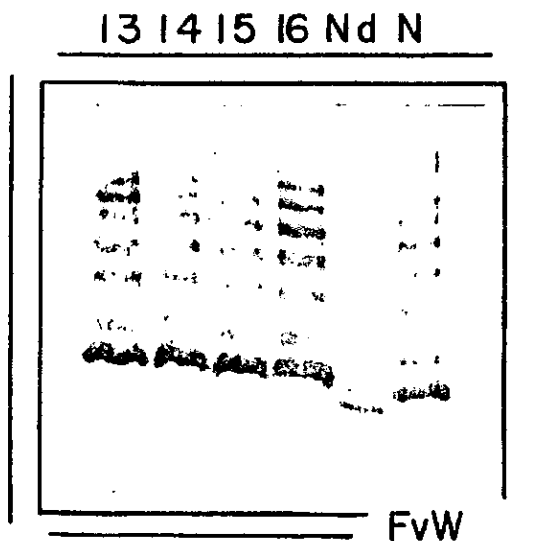
El paciente 5 todos los multímeros están presentes un poco disminuidos los de mayor peso molecular IIB.



Los pacientes 6, 7 y 8 la imagen es muy tenue poco perceptible pero comparado con el patrón normal y el normal diluido al 10% vemos que están disminuidos en cantidad todos los multímeros de alto peso molecular semejante a las variantes IIA.



Los pacientes 9,10,11 y 12. - Se observa una imagen de patrón multimérico normal, en las pruebas de escrutinio fueron descartados como enfermos tipo vW.



Muestras 13,14,15, y 16 personas sanas muestran completo su patrón multimérico con relación al patrón normal y al patrón diluido al 10%, como puede verse resumido en la tabla de resultados.

CAPITULO V DISCUSION

1. En un estudio comparativo de tres métodos para la visualización de los multímeros del factor Von Willebrand (FvW) A) Autoradiografía (I 125), B) Electroblot con un sistema de peroxidasa de rábano Western-Blot-HRP, C) El Electroblot avidina-biotina University of Miami) 1990.

El objetivo de éste estudio fue poner a prueba los métodos inmunoenzimáticos de tefido para determinar si estas alternativas podrían ofrecer resultados comparables en la visualización de los multímeros de (FvW) así como en los aspectos técnicos.

La mayor desventaja para la autoradiografía es la necesidad de un anticuerpo radioetiquetado y las precauciones de seguridad vinculadas, sin embargo este anticuerpo puede ser usado repetidamente para ahorrar en el costo de la prueba. En las técnicas inmunoenzimáticas disponibles comercialmente utilizan anticuerpos y kit de detección que incrementan el costo del examen en AV-BIO y casi al doble en la técnica BLOT-HRP. Sin embargo los reactivos comerciales están fácilmente disponibles (USA) y ayudan en la reproducción de la prueba y en la estandarización de los resultados. La evaluación de seguimiento de tiempo mostró que se necesitaba un mínimo de 5 días para 8I 1259 y AV-BIO, en contraste Electroblot modificado requirió solo dos días, este ahorro de tiempo ofrece una contribución significativa al tiempo de laboratorio. Los métodos (I 125) y AV-BIO fueron mejores que el BLOT-HRP al detectar los multímeros de alto peso molecular, además el método AV-BIO fue superior en la delineación de las bandas mostrando aproximadamente 20 multímeros distintos y este método es el empleado en este trabajo.

El Factor Von Willebrand (FvW) es una glicoproteína plasmática sintetizada por el endotelio y megacariocitos y almacenada en células endoteliales y plaquetas para su uso posterior. Los

dímeros formados por los enlaces disulfuro intercadena son ensamblados y procesados en estructuras multimérica variando en peso molecular desde 500, 000 a 1,900,000 daltones. FvF es requerido para una función normal de las plaquetas. Promueve la adhesividad de las plaquetas al subendotelio vascular expuesto, promoviendo la formación del trombo plaquetario. También une FVIII. C en forma no covalente y por lo tanto retarda su eliminación de la circulación.

CAPITULO VI CONCLUSIONES

1. Factibilidad beneficio de la Técnica propuesta.

El estudio de la distribución de los multímeros de la EvW pueden ser evaluadas cualitativamente por la técnica del gel de agarosa en un medio que contenga Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) detergente iónico de esta manera los multímeros quedan cargados eléctricamente y de manera uniforme, la migración electroforética depende únicamente de su peso molecular, posteriormente la transferencia a papeles de nitrocelulosa (blotting) es muy útil para preservar los resultados para su estudio y diagnóstico.

Sería acertado tener disponible ésta técnica en los hospitales centrales de nuestro país para establecer con precisión los diagnósticos de los pacientes que se envían de los hospitales periféricos y clínicas presuntamente con enfermedad de von Willebrand.

2. Análisis del costo y tiempo para diagnosticar la enfermedad de von Willebrand.

Cuando se terminó la parte practica de este proyecto en el Hospital de Especialidades del Centro Medico "LA RAZA" del Seguro Social fue muy gratificante que después de muchos intentos el 30 de junio de 1993 aparecieran en el gel de agarosa las primeras bandas características de los multímeros de von Willebrand. Habíamos calculado para ese entonces que unos estudios completos para la clasificación de la enfermedad seria de 600 dólares y el tiempo necesario para su realización de aproximadamente una semana. Hoy en día con el avance tecnológico de muchos hospitales la situación ha cambiado y con ello la tendencia de reducir el tiempo y los

costos son muy alentadores. Por otro lado es muy común en la vida cotidiana si no es que todos hemos tenido contacto con alguna persona con alteraciones de la coagulación ya sean epistaxis, petequias, equimosis, gingivorragias, hematurias, o sangrados de leves a prolongados causados por heridas o después de intervenciones quirúrgicas sencillas, eventos que de por si llaman mucho la atención son remitidos con algún especialista que inmediatamente comienza por el estudio familiar y clínico del paciente para ofrecer su diagnostico y pronostico del padecimiento.

Si en todos los hospitales centrales se contara con personal y equipo necesario como existen muchos en el Distrito Federal y en el interior del país seria posible y de gran utilidad como se propone en este trabajo las **Pruebas de escrutinio para establecer el diagnostico de la enfermedad de von Willebrand.**

La enfermedad de FvW es una alteración genética que es transmitida de manera autosómica y es caracterizada por sangrados. Es un grupo heterogéneo pero todas las formas de la enfermedad son causadas por cambios en la FvW: ya sea en la síntesis liberación, y/o estructura. En la FvW. Tipo I, todas las formas multiméricas estan presentes pero en cantidades menores. La FvW tipo II es caracterizada por la ausencia de formas más grandes y/o intermedias. En el tipo III, también llamada tipo I "severa" por algunos investigadores, todas las formas multiméricas están presentes pero todos los niveles usualmente se encuentran por debajo del 1%.

BIBLIOGRAFIA

1. Ivi, A.C.: shapiro, P.G y Melnick, P. The bleeding tendency in Jaundice surg. Gynec. Obstr. 60: 781, 1935.
2. Mielke j ch., Kenshiro M.M., Woiner J.A and. Rappaport J.M. the standardized normal Ivy bleeding time and its prolongation.
3. PROCTOR R. AND RAPAPORT S. THE PARIAL THROMPLASTIN TIME WHIT KAOLIN. J CLIN PATH 36,213,1961.
4. Hardisty, R.M., MacPherson, J.C. and Ingram, G.J.C: A one stage factor VII assay and its use on venous and capillary plasma. Thrombosis at Diathesis Haemorrhagica 7: 215 – 229,1962.
5. Maschall, S.. An evaluation of the one stage factor VIII assay, Canadian J. Medical Tech. 27. 103-117,1965.
6. Owen C.A. and Bollman, Proc.Exp. biol.Med. 67.231,1647
7. Koller F., Loeliger A. And duckert, F.: Act. Huemat. 6.1, 1951.
8. Am J Clin pathol 63-216, 1976.Çb
9. Born, g.V.r. Aggregation of blood platelets by adenoside and its reversal nature (London) 194:927, 1962.
10. O'Brien, J.R platelet aggregation prt 21 some results from a new method of study J.clinic. path 15.452, 1962.
11. Zaverio M, Ruggeri and Theodore s. Zimmerman von Willebrand and Factor of von Willebrand disease. Blood vol 4 No. 4 october 1987
12. Kattolone, H.E., Gómez M.H. Studies on the mecanum of ristocetin – inducet platelet aggregation, blood Vol. 45, No.1; 91, 1975.

13. Weiss platelet physiology and abnormalities of platelet function. The new england journal of medicine, par 1,293:53, part 2,293.580, 1975.
14. Donald K. Morisato and Harvey R. Gralnick. Selective binding of the Factor VIII von Willebrand Factor protein to Human Platelets Blood vol 55 No. 1 1980.
15. J. Evan Sadler A revised classification of von Willebrand Disease. Thrombosis and Haemostasis 71(4) 520-5- 1994.
16. M.R. Ledford, J. W. Kent, and F. Civantos. A Comparative Study of Three Methods for the visualization of von Willebrand Factor (vFW) Multimers Thrombosis and Haemostasis 64 (4)569 – 575 (1990).
17. Ted Koster, Andrew D Blann, Ernest Briët, Jan P. Vandenbroucke, Frits R Rosendaal Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. The lancet vol 345. January 21, 1995.