

Enfermedad de von Willebrand tipo 2N "Normandy"

**Alejandro Morales-De la Vega,¹
Elba Reyes-Maldonado,²
Carlos Martínez-Murillo,³
Sandra Quintana-González⁴**

¹Laboratorio Central, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)

²Laboratorio de Citología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional
³Médico hematólogo, Unidad de Investigación Médica y Servicio de Hematología, Hospital Regional 1 "Gabriel Mancera", IMSS

⁴Médico hematólogo, Servicio de Hematología, Hospital Regional 1 "Gabriel Mancera", IMSS

Comunicación con:
Alejandro Morales-De la Vega.
Tel: 8500 7687 y 5627 6900, extensión 21373.
Correo electrónico:
ale_morav@yahoo.com.mx

RESUMEN

Introducción: en la variante 2N de la enfermedad de von Willebrand, los resultados de los estudios de laboratorio son indistinguibles a los de la hemofilia A hasta que se realiza la técnica que evalúa la función del enlace FvW:FVIII.

Objetivo: determinar la prevalencia de la enfermedad de von Willebrand tipo 2N en pacientes con diagnóstico de hemofilia A y enfermedad de von Willebrand tipo 1.

Material y métodos: se incluyeron 12 donadores sanos y 25 pacientes con diagnóstico de hemofilia A (una portadora) y cinco con sospecha de EvW tipo 1, a los que se les practicaron las pruebas de hemostasia comunes para este tipo de afecciones, más la técnica de afinidad de enlace FvW:FVIII recombinante (F VIIIr).

Resultados: los resultados de laboratorio fueron concordantes con los diagnósticos previos, sólo en tres con diagnóstico previo de hemofilia A resultaron con una tasa de afinidad de enlace FvW:FVIIIr inferior al intervalo de referencia de los donadores sanos, por lo que corresponden a EvW 2N.

Conclusiones: el método de detección de EvW 2N empleado permitió identificar, por primera vez en México, los primeros casos de esta variante con una prevalencia de 10%. Este método permitirá establecer diagnósticos de certeza en nuestro país y tratamientos más específicos.

SUMMARY

Introduction: the results of the laboratory test for 2N von Willebrand disease (2N vWD) are indistinguishable from those of light or moderate haemophilia A, until the technique that evaluates the operation of the vWF: FVIII binding is performed.

Objective: to determine the prevalence of type 2N vWD in patients diagnosed with light or moderate haemophilia A and type 1 vWD. **Material and methods:** twelve healthy donors and twenty-five patients diagnosed with haemophilia A (a carrier) and five suspected of type 1 vWD were included in the study. The common tests of haemostasis for this condition plus the technique of the relationship of the vWF: FVIII recombinant (F VIIIr) binding was performed.

Results: the laboratory results of the 30 patients were concordant with the previous diagnosis. However, three with a previous diagnosis of haemophilia A demonstrated a rate of relationship of the vWF: F VIIIr binding lower than the reference interval obtained from the healthy donors, which means it corresponds to 2N vWD.

Conclusions: the screening method of 2N vWD employed in this study allowed to identify for first time in Mexico, the first cases of this variant with a prevalence of 10%. In our country, this method will allow to establishing accurate diagnosis of 2N vWD and to providing specific treatments.

Recibido: 9 de junio de 2006

Aceptado: 15 de agosto de 2006

Introducción

La enfermedad de von Willebrand (EvW) es un trastorno hereditario causado por alteraciones cuantitativas o funcionales de la proteína conocida como factor de von Willebrand (FvW).¹ Aunque no son muchos los estudios realizados a nivel mundial, se considera que es el trastorno

hereditario más común de la hemostasia, afectando por igual a hombres y mujeres.²⁻⁶ Los datos de incidencia son variables. Rodeghiero y colaboradores, en 1987, indican una frecuencia tan alta como 8.2 /1000 personas (0.82 %).⁷ En México, se han informado 60 casos en 24 familias con diagnóstico de EvW, pero la incidencia real se desconoce.⁸ Dada su heteroge-

Palabras clave

- ✓ enfermedad de von Willebrand
- ✓ hemofilia A
- ✓ factor VIII
- ✓ coagulación sanguínea

Key words

- ✓ von Willebrand disease
- ✓ hemophilia A
- ✓ factor VIII
- ✓ blood coagulation

neidad genética y clínica, los patrones de laboratorio muestran variabilidad, lo que requiere de una infraestructura para su diagnóstico, por lo que la frecuencia de la enfermedad podría superar lo informado en la literatura.^{6,9}

El FvW es una glicoproteína que se sintetiza en las células endoteliales y en los megacariocitos. Circula en el plasma bajo la forma de multímeros unidos por enlaces disulfuro con dimensiones que van de 5×10^5 a 20×10^6 D. Tiene dos funciones principales: participa tanto en la hemostasia primaria como secundaria; primero, mediando la adhesión de las plaquetas al subendotelio dañado y participando en la agregación plaquetaria, y segundo, como acreedor y protector del FVIII:C.^{4,5,10-12}

El FvW es codificado por un gen grande (178 pares de kilobases, casi 10 veces más largo que el de la hemoglobina), que se localiza en el brazo corto distal del cromosoma 12 humano, compuesto por 52 intrones y exones, y 9 kb el ARN mensajero.^{5,7,10,11,13,14}

El primer producto es un FvW pre-pro maduro de una sola cadena proteica de 2813 aminoácidos y con un peso molecular de 360 kD, un propéptido grande de 741 residuos y una subunidad madura de 2050 residuos.¹⁴

La presencia de mutaciones en el FvW da como resultado alteraciones tanto en la cantidad como en la calidad del mismo. Se han conseguido evaluar las alteraciones cualitativas, estructurales y funcionales que pudiera tener el FvW plasmático o plaquetario,^{2,6,10,15-20} por lo que desde 1994 el subcomité para el estudio del FvW de la Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis desarrolló una nueva clasificación, basada principalmente en el fenotipo de laboratorio de la proteína del FvW⁹ y que reconoce tres variantes: EvW tipo 1, con una distribución normal de multímeros y todas las formas moleculares están proporcionalmente disminuidas; EvW tipo 2A que presenta una ausencia de multímeros grandes de FvW con la consecuente falla en la adhesión plaquetaria *in vivo* dependiente del FvW; EvW tipo 2B que se caracteriza por un incremento en la afinidad del FvW por las plaquetas que conduce a un enlace espontáneo de grandes multímeros de FvW a las plaquetas *in vivo*, seguido por una depuración de ambos; EvW tipo 2M que incluye variantes en las cuales la ad-

hesión plaquetaria está dañada pero la distribución de los multímeros es normal; EvW 2N causada por mutaciones sin sentido en la molécula de FvW que inactivan selectivamente el sitio de enlace al FVIII:C y EvW tipo 3, trastorno recesivo en el cual la proteína de FvW virtualmente no se detecta.

La variante de más reciente descripción es la 2N o Normandy en la que distintas sustituciones de un solo aminoácido en el FvW maduro en las posiciones 19 (Arg → Trp), 22 (Gly → Glu), 28 (Thr → Met), 53 (Arg → Trp), 54 (His → Gln), 91 (Arg → Gln) (la más frecuente) y 24 (Glu → Lys), que están localizadas en el dominio D' y 116 (Asp → Asn) en el dominio D3,^{21,22} dan como resultado una capacidad de enlace disminuida por el FVIII y provoca, por consiguiente, una disminución en grado variable del FVIII:C, con un patrón de laboratorio indistinguible de la hemofilia A leve o moderada y similar también a algunas formas de EvW tipo 1. Los pacientes muestran una reducción de la actividad del FVIII mientras que la concentración de FvW es normal; además, el patrón de herencia es autosómico. También hay pacientes que se diagnostican erróneamente como EvW tipo 1 con actividad de FvW entre 35 y 50 % normal, mientras que la actividad del FVIII:C se encuentra desproporcionadamente disminuida^{23,24} y puede tratarse de EvW 2N. Los dos primeros trabajos que describieron este padecimiento fueron realizados en Francia por Mazurier²³ y Nishino,²⁴ en pacientes femeninas de la región de Normandía con datos clínicos y de laboratorio propios de hemofilia A moderada. Posteriormente surgieron otros grupos en Francia, Estados Unidos, Alemania, España, Italia, Inglaterra, Holanda, Israel y Japón que muestran la universalidad del padecimiento y que informan prevalencias variables de 0.8 a 9.1 % en varones y de 2.9 a 25 % en mujeres con deficiencia de FVIII:C.²¹ Existen trabajos posteriores en Australia,²⁵ Brasil²⁶ y Eslovenia²⁷ en los que no se menciona prevalencia pero sí presencia de esta afección en esos países. La técnica original descrita entre 1989 y 1990^{23,24} consiste en un método de ELISA modificado en el que se utilizan placas de microtitulación sensibilizadas con anticuerpo policlonal anti FvW seguido de la adición de plasma problema; des-

pués se agrega FVIII purificado y posteriormente se revela la cantidad de FVIII ligada con reactivos cromogénicos. Los resultados se informan cualitativamente; sin embargo, en los años siguientes surgieron modificaciones al mismo, que han permitido abreviar el tiempo de ejecución, así como generar un resultado cuantitativo, lo que facilita la interpretación de los resultados.²⁸ Cabe hacer mención que es ideal completar el estudio de afinidad FvW:FVIII con la determinación de la mutación causante del defecto.

El riesgo de diagnósticos equivocados de hemofilia leve o moderada así como de EvW tipo 1 puede estar sucediendo en nuestro país, ya que no existe ningún centro que tenga incluida esta técnica en su panel de pruebas para el estudio de las afecciones hemorrágicas, por lo que tomando en consideración que en el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI se encuentra una de las clínicas de Hemofilia y EvW más importante de nuestro país. Allí se propuso investigar la prevalencia de la EvW 2N en pacientes con diagnóstico de hemofilia A leve o moderada y EvW tipo 1.

Material y métodos

Se realizó un estudio transversal para conocer la prevalencia de la EvW 2 N en 5 pacientes con sospecha clínica de EvW y 25 con diagnóstico de hemofilia A leve o moderada con base en datos clínicos y de concentración de FVIII:C, todos ellos pertenecientes a la Clínica de Hemofilia del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS. Participaron también 12 personas sanas, donadores de sangre de la misma institución, como testigos normales. Tanto pacientes como donadores sanos fueron informados del estudio y se obtuvo su consentimiento de acuerdo con la declaración de Helsinki. A cada uno de los pacientes se les practicó la prueba de TS (tiempo de sangrado) por el método de Ivy modificado (Simplate II, Organon Teknika), se les extrajeron 15 mL de sangre que se distribuyeron de la siguiente manera: 5 mL en un tubo con EDTA como anticoagulante y 10 mL en 4 tubos con citrato de sodio a 3.8 % en volúmenes iguales (2.5 mL para cada tubo).

A partir de los tubos con EDTA se determinó la cuenta de plaquetas por el método de resistencia eléctrica en el analizador Coulter modelo STKS. Los tubos citratados se centrifugaron a 1500 g durante 15 minutos y se separaron los plasmas en cuatro alícuotas de 1.5 mL. Tres alícuotas de cada paciente se guardaron a -70° C y a la restante se le practicaron las siguientes pruebas de laboratorio: tiempo de protrombina (TP) por el método de Quick,²⁹ tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa),³⁰ tiempo de trombina (TT),³¹ cuantificación de fibrinógeno (Fibr) por el método de Clauss.³² Estas cuatro mediciones son ensayos coagulométricos adaptados al equipo automatizado modelo STA de Diagnostica STAGO, actividad de FVIII coagulante (FVIII:C) método coagulométrico³³ en equipo automatizado, actividad de FvW antigénico (FvW:Ag) por método ELISA,³⁴ actividad del cofactor de ristocetina del FvW (FvW:RCo) por el método de aglutinación³⁵ y afinidad del enlace FvW: FVIII purificado para determinar la prevalencia de EvW 2N por el método de ELISA siguiendo la metodología propuesta por Casonato²⁸ con algunas modificaciones.

Prueba de afinidad de enlace FVIIIr-FvW inmovilizado

Se cubrieron placas de microtitulación para ELISA con 200 μ L de anticuerpo policlonal contra FvW humano (Dako A/S, Glostrup, Dinamarca) 1.5 μ g/mL en amortiguador de carbonato/bicarbonato 0.05 M a pH = 9.6 dejando la fila 12 de la placa sin sensibilizar (blanco). Se dejaron toda la noche a 4 $^{\circ}$ C. Al día siguiente se lavaron una vez con amortiguador de fosfatos salino (PBS) 0.01 M, pH = 7.4 con 0.1 % de Tween 20 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Posteriormente, los pozos se bloquearon con 200 μ L de PBS conteniendo 2.5 % de albúmina sérica bovina y 0.05 % de Tween 20 durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron con PBS-Tween y guardaron hasta su uso a 4 $^{\circ}$ C. Se diluyó la mezcla de plasmas testigo: 1/2, 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, y 1/320, así como los problemas y testigos 1/5 y 1/80. Se depositaron en el pozo correspondiente 100 μ L de cada

dilución de plasmas y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. A los blanco se les adicionaron 100 μ L de amortiguador. Se realizaron 5 lavados de 1 minuto y añadieron 100 μ L de cloruro de calcio 0.4 M (J. T. Baker S. A. de C. V., Xalostoc, Mex.) y se dejó reposar 30 minutos. Se lavaron 5 veces y adicionaron 100 μ L de F VIIIr (Baxter Healthcare Corporation, Glendale, CA, USA) a una concentración 1 UI/mL y dejaron reposar durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron 5 veces y agregaron 100 μ L de anticuerpo policlonal anti FVIII conjugado con peroxidasa (Technically Speakins Cedarlane, Ontario, Canada) diluido 1:500. Se dejó reposar 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Se lavaron los pozos 5 veces y se les agregó color adicionando 100 μ L de dihidrocloruro de fenilendiamina (OPD) (ABBOTT Laboratories, Chicago, IL, USA) por 30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. La reacción se detuvo agregando 50 μ L de ácido clorhídrico 1N. Las lecturas se realizaron 10 minutos después a 492 nm. Se graficaron las absorbancias contra las diluciones siendo el estándar la curva obtenida de la mezcla de plasmas normales.

En cada placa se incluyeron mezcla de plasmas frescos de donadores sanos con los que se construyó la curva estándar, 12 plasmas de donadores sanos a los que se les practicaron las pruebas de TP, TTPa, TT y fibrinógeno antes de

incluirlos, plasma de un paciente con EwW tipo 3 con menos de 2% de tasa de actividad de FvW como testigo positivo para la prueba, y las muestras de los pacientes con sospecha de EvW 2N.

Una vez con las lecturas, las placas se lavaron y posteriormente se agregó anticuerpo anti FvW conjugado con peroxidasa (Diagnostica Stago, Asnieres Seine, Francia) y se revelaron con OPD para determinar la cantidad de FvW ligado a la placa en cada caso (tasa de FvW en %), tomando como referencia la tasa de FvW del plasma testigo ST previamente medida.

En una placa independiente, se corrieron diluciones de FVIIIr a las concentraciones de 12.5, 25, 50, 100 y 150 U/mL para construir una curva estándar de FVIII y determinar la cantidad en U/dL de FVIII ligado por el plasma testigo, los donadores sanos y los pacientes. Con el resultado del FVIII ligado se calculó, por placa, el por ciento de afinidad de cada caso, tomando como 100% la cantidad de FVIII ligado por el plasma testigo a la dilución 1:5.

Dividiendo el porcentaje de afinidad entre la correspondiente tasa de actividad del FvW, se obtiene la tasa de afinidad FVIII/FvW, resultado con el que se define si un paciente presenta disminución anormal en la afinidad de su FvW por el FVIII (EvW normandy) o no. Para tener una cifra de referencia, se tomó el promedio de esta tasa \pm las dos desviaciones estándar de los donadores sanos (0.4-1.6).

Cuadro I
Valores medio, mínimo y máximo obtenidos para las pruebas hemostáticas de escrutinio de la población estudiada y para la mezcla de plasmas de donadores sanos (testigo)

Estudio	Plasma testigo. Media (intervalo)	Pacientes con hemofilia Media (intervalo)	Pacientes con sospecha de EvW. Media (intervalo)
TS	V. Ref. = 2.3 a 9.5 min	4 min 40 seg 2' 45"-7')	6 minutos (3' 15"-8')
TTPa	32.95 seg (30,8 -35.2 seg)	65.82 seg (40.5-108.7)	42.7 seg (33-75.1)
TP	12.58 seg (11.8-13.9 seg)	12.57 seg (11.0-15.7)	13.22 seg (12.3-13.8)
TT	17.34 seg (15.4-20.4 seg)	18.68 seg (15.7-25.1)	18.76 seg (15-22.1)
Fibrinógeno	265.2 mg/dL (215-310 mg/dL)	271.28 mg/dL (173-441)	280.6 mg/dL (243-312)
Plaquetas	V. Ref. = 150-400 x 10 ⁹ /L	228 x 10 ⁹ /L (80-443)	241 x 10 ⁹ /L (202-276)
FVIII:C	105 UI/dL (104-105)	12.9 UI/dL (2-55)	59.2 UI/dL 10-106)
FvW:Ag	106 UI/dL (105-108 %)	90 UI/dL (60-125)	72 UI/dL (51-113)
FvW:RiCof	98 UI/dL (84-112 %)	95 UI/dL (84-112)	72.8 UI/dL (56-84)
Tasa de afinidad FVIII/FvW	1	0.6838 (0.118-1.772)	0.82 (0.589-1.516)

V. Ref. = Valor de referencia.

Resultados

Los 30 pacientes estudiados, 5 con sospecha de EvW, todos procedentes del área metropolitana, 25 hemofílicos de los cuales, 22 procedían del área metropolitana y 3 de provincia (2 de Cuernavaca, Mor., y 1 de Tuxtla Gutiérrez, Chis.). De los 25 pacientes hemofílicos, 1 fue del sexo femenino (portadora con lionización) y 24 del sexo masculino, de los sospechosos de EvW, 3 fueron del sexo femenino y 2 del masculino. La edad promedio de los pacientes fue de 30.1 años en el caso de los hemofílicos con un mínimo de 5 y un máximo de 65. Para el caso de los sospechosos de EvW, la edad promedio fue de 19.4 años con un mínimo de 10 y un máximo de 25.

En el cuadro I se presentan los valores medios obtenidos y el intervalo para las pruebas de escrutinio de la población estudiada, así como para la mezcla de plasma de los donadores sanos (plasma testigo): tiempo de sangrado (TS), tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa), tiempo de protrombina (TP), tiempo de trombina (TT), cuantificación de fibrinógeno, recuento de plaquetas así como la determinación de factor VIII coagulante (FVIII:C), factor de von Willebrand antigénico (FvW:Ag), cofactor de ristocetina (FvW:RiCof) y tasa de afinidad de enlace FVIII/FvW. Los valores de los resultados obtenidos del plasma testigo que se utilizó como control para cada una de las pruebas estuvieron dentro de los rangos de los valores de referencia.

En los pacientes con sospecha de EvW y hemofilia se observa una prolongación de los valores del TTPa, siendo más notoria para los pacientes con hemofilia. Los promedios de TP, TT, fibrinógeno y recuento de plaquetas se encuentran dentro de los valores normales. Se aprecian valores normales del plasma testigo para las pruebas de FVIII:C, FvW:Ag y FvW:RiCof, pero disminución en los valores de FVIII:C para población de hemofílicos y para la población con sospecha de EvW, siendo más notoria en los primeros. Los valores obtenidos para la determinación de FvW:Ag y FvW:RiCof de ambas poblaciones también están dentro de los valores normales, aunque el promedio de la población con posible EvW es menor. El promedio de los valores obteni-

dos de la prueba de afinidad de enlace FvW-FVIII:C es más alto en la población con posible EvW que en los hemofílicos, y es en este grupo donde están los posibles afectados de la variante Normandy de EvW.

Se utilizaron como estándar los promedios obtenidos de las lecturas de absorbancia de las diluciones del plasma testigo con las que se construyó la curva para cada placa utilizada.

Con los datos de las U/dL de F VIIIr ligado por el plasma de los 12 donadores sanos incluidos en el estudio, se calculó el porcentaje de afinidad. Con el cociente de este porcentaje se calculó la tasa de Afinidad F VIIIr - FvW:Ag de cada uno (como se mencionó en métodos) para así determinar el rango de referencia de la tasa que se utilizó para discriminar a los pacientes con EvW 2N de los que no la padecen. Los resultados se muestran en el cuadro II. Tomando como base este rango, se diagnosticaron y reclasificaron 3 pacientes con diagnóstico previo de hemofilia A (una leve y dos moderadas), como EvW 2N que obtuvieron tasas inferiores a 0.4 (cuadro III).

La tasa de afinidad del F VIIIr/FvW:Ag promedio del plasma del paciente con EvW tipo 3 que se utilizó como testigo positivo para la prueba fue de 0.0061, lo que permitió verificar la eficacia del método.

Cuadro II
Valores del FVIII recombinante ligado por cada donador sano estudiado, porcentaje de afinidad, tasa de actividad del FvW antigénico y la tasa de afinidad al FVIII/FvW:Ag

Muestra	Afinidad %	(FvW) U/dL	Tasa de afinidad FVIII/FvW
1	69.29692	66	1.053
2	74.94432	86	0.870
3	76.14024	96	0.797
4	98.31054	83	1.180
5	122.0211	75	1.635
6	60.72678	62	0.986
7	77.178	108	0.713
8	85.443	80	1.065
9	54.264	103	0.530
10	75.468	71	1.058
11	133.95	94	1.426
12	92.454	107	0.864
Media	79.81		1.0007
DE	23.57		0.3022
Rango	56.24-103.38		0.4 -1.6

Discusión

Se estudiaron 25 pacientes con diagnóstico de hemofilia (una portadora con lyonización) y 5 con diagnóstico de EvW. Ambas entidades constituyen las enfermedades hemorrágicas hereditarias más frecuentes en el mundo.²⁻⁶ Por los valores medios obtenidos para las pruebas hemostáticas de escrutinio y confirmatorias para ambas poblaciones se observó alargamiento marcado en el TTPa, dejando claro que ambos defectos afectan la vía intrínseca de la coagulación sanguínea debido a la disminución de la actividad del FVIII, siendo más notoria en la población hemofílica. Sin embargo, en esta población están incluidos pacientes con EvW 2N, aunque es un hecho que en virtud de los resultados informados en la literatura internacional, la EvW 2N es una causa no tan rara de deficiencia de FVIII plasmático.³¹ Así mismo, como se observa en dicho cuadro con las pruebas de laboratorio de escrutinio, no se puede discriminar a los pacientes con EvW 2N. Por tal motivo, es indispensable, incluir la prueba de detección de EvW 2N en pacientes con hemofilia leve y moderada.

Para determinar los valores de referencia de la tasa de afinidad de enlace en nuestra población se utilizaron plasmas de donadores sanos que sirvieron para validar la actividad normal de transporte de FVIII. Todos fueron individuos clínicamente sanos cuyas pruebas de escrutinio presentaron valores normales. Esto nos permitió trabajar con la confianza de tener una población de referencia normal. Así mismo, se describe el método de ELISA para la medición de la capacidad del FvW para transportar al FVIII. El método permite diferenciar a los pacientes con resultados de laboratorio similares a los de hemofilia A, o a los

pacientes con EvW tipo 1 con baja actividad del FVIII, como se mostró en el cuadro I.

El método utilizado en este trabajo (Casonato y colaboradores²⁸) permite obtener resultados cuantitativos, a diferencia de trabajos anteriores en que se expresan cualitativamente.^{21,36-39}

En el cuadro II se presentaron los valores de referencia obtenidos para la tasa de afinidad de enlace FVIII/FvW:Ag de cada donador, con promedio y desviación estándar de la población y del que se obtuvo el intervalo de referencia de 0.4 a 1.6, similar pero más amplio que el informado por Casonato, de 0.6 a 1.3, resultado obtenido del análisis de 55 voluntarios estudiados. Posiblemente se acortaría un poco este intervalo para nuestra población si se incrementa el número de donadores.

Fueron tres los pacientes con valores inferiores de tasa de afinidad de enlace FVIIIr/FvW al intervalo obtenido a partir de los donadores sanos (cuadro III). En ellos se aprecian pruebas de escrutinio y definitivas compatibles con hemofilia A. No existe ningún defecto plaquetario ni está afectada la capacidad adhesiva del FvW, como lo demuestran los resultados de la actividad del cofactor de ristocetina (FvW:RCo). Todos ellos presentan un TTPa muy prolongado (superiores a los 50 seg) que es reflejo de la baja actividad del FVIII coagulante, la cual es inferior a 10 % en todos los casos. Todos manejan concentraciones de FvW dentro de lo normal pero muy baja capacidad para transportar al FVIII (afinidad de enlace), con dos valores francamente bajos (menores de 0.2) y uno cercano al límite inferior normal de 0.4.

La prevalencia de la EvW 2N en la población estudiada fue de 10 % y de 10.3 % si consideramos únicamente al grupo de varones (3/29), similar a la informada por el grupo de

Cuadro III

Resultados de las pruebas hemostáticas practicadas a los pacientes con datos de tasa de afinidad FVIII/FvW compatibles con EvW 2N

Pac.	TS	Plaq. x 10 ⁹ /L	TTPa seg	TP seg	TT seg	Fibrin. mg/dL	FVIII:C UI/dL	FvW:Ag UI/dL	FvW:RICO F UI/dL	T. de AF. Enlace
1	3'45"	200	55.0	11.2	18.6	218	8	72	84	0.118
2	3'45"	288	83.0	11.2	19.5	393	3	60	84	0.161
3	6'30"	297	96.9	12.7	17.8	225	2	110	112	0.343

Milwaukee, EUA., de 9.1 % en población masculina.²¹ La prevalencia informada por Casonato fue de 5.3 % (1/19) en pacientes con diagnóstico previo de EvW tipo 1.²⁸

Anteriormente, la única prueba que evaluaba la funcionalidad del FvW *in vitro* era el FvW:RCO, que estudia la capacidad adhesiva del FvW,²⁸ de aquí la importancia de incluir esta técnica en el panel de estudios de los pacientes con EvW y que tengan disminuida la actividad del FVIII coagulante, así como en el de los hemofílicos. En los países desarrollados se complementa con la determinación de las mutaciones que afectan al FvW y condicionan la disminución de la afinidad por el FVIII plasmático,^{21,36,37,40-45} prueba irrefutable de la existencia de este trastorno hereditario.

El diagnóstico correcto también tiene importancia para la aplicación de una terapia específica, incluyendo el consejo genético acerca del bajo riesgo de transmisión, evitar la administración de FVIII ultrapurificado o el tratamiento con DDAVP que incrementa los niveles de FVIII que serán depurados en corto tiempo.

Este método está informado como la prueba de detección de EvW 2N; sin embargo, el estándar de oro es el método de PCR para la determinación de la mutación. No obstante, es importante señalar que en los trabajos publicados ninguno informa falsos positivos para la prueba de afinidad de enlace FvW:FVIIIr, pues todos los casos con afinidad disminuida por debajo de los valores de referencia se comprobaron con la presencia de alguna de las mutaciones mencionadas. Ante esto, para nuestro país y dado que es el primer trabajo realizado para el diagnóstico de EvW tipo Normandy, podemos considerar el método utilizado como una prueba útil para la detección de la variante 2N de enfermedad de von Willebrand en pacientes hemofílicos.

Se espera que con la implementación de esta técnica se puedan corregir diagnósticos falsos de hemofilia A y EvW, por lo que es importante disponer de métodos novedosos que permitan el diagnóstico de certeza de enfermedades fáciles de confundir con otras, tanto en su presentación clínica como en los resultados de laboratorio, como sucede con las enfermedades hemorrágicas hereditarias.

Referencias

1. Berntorp E, Ingerslev J, Schulman S. Von Willebrand disease: an update in the Aland islands. Summary of a Nordic Symposium on von Willebrand disease, 24–25 September 1998, Mariehamn, Aland. *Haemophilia* 1999;5(Suppl. 2):1-6.
2. Favalaro EJ, Facey D, Grispo L. Laboratory assessment of von Willebrand factor. *AJCP* 1995;104: 264-271.
3. Jorieux S, Tuley EA, Gaucher C, Mazurier C, Sadler JE. The mutation Arg(53) → Trp causes von Willebrand disease Normandy by abolishing binding to factor VIII. Studies with recombinant von Willebrand factor. *Blood* 1992;79:563-567.
4. Ruggeri ZM. Pathogenesis and classification of von Willebrand disease. *Haemostasis* 1994;24: 265-275.
5. Schneppenheim R, Thomas KB, Sutor AH. Von Willebrand disease in childhood. *Semin Thromb Hemost* 1995;21:261-275.
6. Triplett DA. Laboratory diagnosis of von Willebrand's disease. *Mayo Clin Proc* 1991;66: 832-840.
7. Rodeghiero F, Castaman G, Dini E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood* 1987;69:454-459.
8. Ambriz R, Avilés A, Reyna MP, Ballesteros L, Pizzuto J. Enfermedad de von Willebrand. Informe de 60 casos en 24 familias en México. *Rev Med IMSS* 1984;22:241.
9. Sadler JE, Gralnick R. Commentary: a new classification for von Willebrand disease. *Blood* 1994; 84:676-679.
10. Ewenstein BM. Von Willebrand disease. *Annu Rev Med* 1997;48:525-542.
11. Gralnick HR, Williams SB, McKeown LP, Magruder L, Hansmann K, Vail M, Parker RI. Platelet von Willebrand factor. *Mayo Clin Proc* 1991; 66:634-640.
12. Meyer D, Piétu G, Fressinaud E, Girma JP. Von Willebrand factor: structure and function. *Mayo Clin Proc* 1991;66:516-523.
13. Ginsburg D. The molecular biology of von Willebrand disease. *Haemophilia* 1999;5(Suppl. 2):19-27.
14. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 395-424.
15. Federici AB, Mannucci M. Diagnosis and management of von Willebrand disease. *Haemophilia* 1999;5(Suppl. 2):28-37.
16. Goodeve AC. Laboratory methods for the genetic diagnosis of bleeding disorders. *Clin Lab Haem* 1998;20:3-19.
17. Ingerslev J, Gürsel T. Diagnosis of von Willebrand disease. *Haemophilia* 1999;5(Suppl. 2):50-56.
18. Rick ME. Laboratory diagnosis of von Willebrand's disease. *Clin Lab Med* 1994;14:781-794.

19. Schulman S. Haemostatic and replacement therapy in von Willebrand disease. *Haemophilia* 1999;5 (Suppl. 2):57-59.
20. Slaughter TF, Parker JK, Greenberg CS. A rapid method for the diagnosis of von Willebrand's disease subtypes by the clinical laboratory. *Arch Pathol Lab Med* 1995;119:148-152.
21. Mazurier C, Meyer D. Factor VIII binding assay of von Willebrand factor and the diagnosis of type 2N von Willebrand disease –results of an international survey. *Thromb Haemost* 1996;76: 270-274.
22. Meyer D, Fressinaud E, Gaucher C, Lavergne JM, Hilbert L, Ribba AS, et al. Gene defects in 150 unrelated french cases with type 2 von Willebrand disease: from the patient to the gene. *Thromb Haemost* 1997;78:451-456.
23. Mazurier C, Gaucher C, Jorieux S, Parquet-Gerniez A, Goudemand M. Evidence for a von Willebrand factor defect in factor VIII binding in three members of a family previously misdiagnosed mild haemophilia A and carriers: consequences for therapy and genetic counselling. *Br J Haematol* 1990; 76:372-379.
24. Nishino M, Girma JP, Rothschild C, Fressinaud E, Meyer D. New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII. *Blood* 1989;74:1591-1599.
25. Rodgers SE, Lerda NV, Favaloro EJ, Duncan EM, Casey GJ, Quinn DM, et al. Identification of von Willebrand disease type 2N (Normandy) in Australia: a cross-laboratory investigation using different methods. *Am J Clin Pathol* 2002;118:269-276.
26. Simon D, Roisenberg I. Type 2N von Willebrand disease mutations in Brazilian individuals. *Haemophilia* 2004;10:473-476.
27. Zarnovicanova M, Pelikanova S. Von Willebrand disease-type 2N (case report). *Vnitr Lek* 2003;49: 319-321.
28. Casonato A, Pontara E, Zerbinati P, Zucchetto A, Girolami A. The evaluation of factor VIII binding activity of von Willebrand factor by means of an ELISA method: significance and practical implications. *Am J Clin Pathol* 1998;109:347.
29. NCCLS Document H21-A2: collection, transport and processing of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulations assays. Second Edition, Approved Guideline 11,23:1991.
30. Proctor R, Rapaport S. The partial thromboplastin with kaolin. *Am J Clin Pathol* 1961;36:212-219.
31. Blomback B, Laurent T C. N-terminal and light-scattering studies on fibrinogen and its transformation to fibrin. *Arkiv för Kemi* 1958;12:137-146.
32. Destaing F, Duzer A, Ferrand B, Portier A. Dosage du fibrinogène par la micro-méthode de coagulation de von A Clauss. *Pathol Biol (Paris)* 1960;8: 1616-1621.
33. Zacharki LR, Resenstein R. Standardization of the one-stage assay for factor VIII (antihemophilic factor). *Am J Clin Pathol* 1978;70:280-286.
34. Bartlett A, Dormandy KM, Hawkey CM, Stableforth P, Voller A. Factor VIII related antigen: measurement by enzyme immunoassay. *Br Med J* 1976;1:994-996.
35. Macfarlane DE, Stibbe J, Kirby EP, Zucker MB, Grant RA, McPherson J. A method for assaying von Willebrand factor (ristocetin cofactor). *Thromb Diath Haemorrh* 1975;34:306-308.
36. Caron C, Mazurier C, Goudemand J. Large experience with a factor VIII binding assay of plasma von Willebrand factor using commercial reagents. *Br J Haematol* 2002;117:716-718.
37. Batlle J, Blanco-López MJ, Castiñeira MP, López-Fernández MF. Importancia del estudio de la unión del factor VIII al factor de von Willebrand en la hemofilia A. *Sangre* 1992;37:224.
38. Schneppenheim R, Budde U, Krey S, Drewke E, Bergmann F, Lechler E, et al. Results of a screening for von Willebrand disease type 2N in patients with suspected haemophilia A or von Willebrand disease type 1. *Thromb Haemost* 1996;76: 598-602.
39. Kroner PA, Foster PA, Fahs SA, Montgomery RR. The defective interaction between von Willebrand factor and factor VIII in a patient with type 1 von Willebrand disease is caused by substitution of Arg19 and His54 in mature von Willebrand factor. *Blood* 1996;87:1013-1021.
40. Schneppenheim R, Lenk H, Obser T, Oldenburg J, Oven F, Schneppenheim S. Recombinant expression of mutations causing von Willebrand disease type Normandy : characterization of a combined defect of factor VIII binding and multimerization. *Thromb Haemost* 2004;92:36-41.
41. Mazurier C. Something new about type Normandy von Willebrand disease (type 2N VWD)? *Thromb Haemost* 2004;92:1-2.
42. Hilbert L, Jorieux S, Fontenay-Roupe M, Guichetau M, Fressinaud E, Meyer D, et al. Expression of two type 2N von Willebrand disease mutations identified in exon 18 of von Willebrand factor gene. *Br J Haematol* 2004;127:184-189.
43. Favaloro EJ, Lillicrap D, Lazzari MA, Cattaneo M, Mazurier C, Woods A, et al. Von Willebrand disease: laboratory aspects of diagnosis and treatment. *Haemophilia* 2004;10(Suppl 4):164-168.
44. Hilbert L, D'Oiron R, Fressinaud E, Meyer D, Mazurier C. First identification and expression of a type 2N von Willebrand disease mutation (E 1078 K) located in exon 25 of von Willebrand factor gene. *J Thromb Haemost* 2004;2:2271-2273.
45. Schneppenheim R. The evolving classification of von Willebrand disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005;16(Suppl 1):S3-S10. 