



Análisis de multímeros de von Willebrand

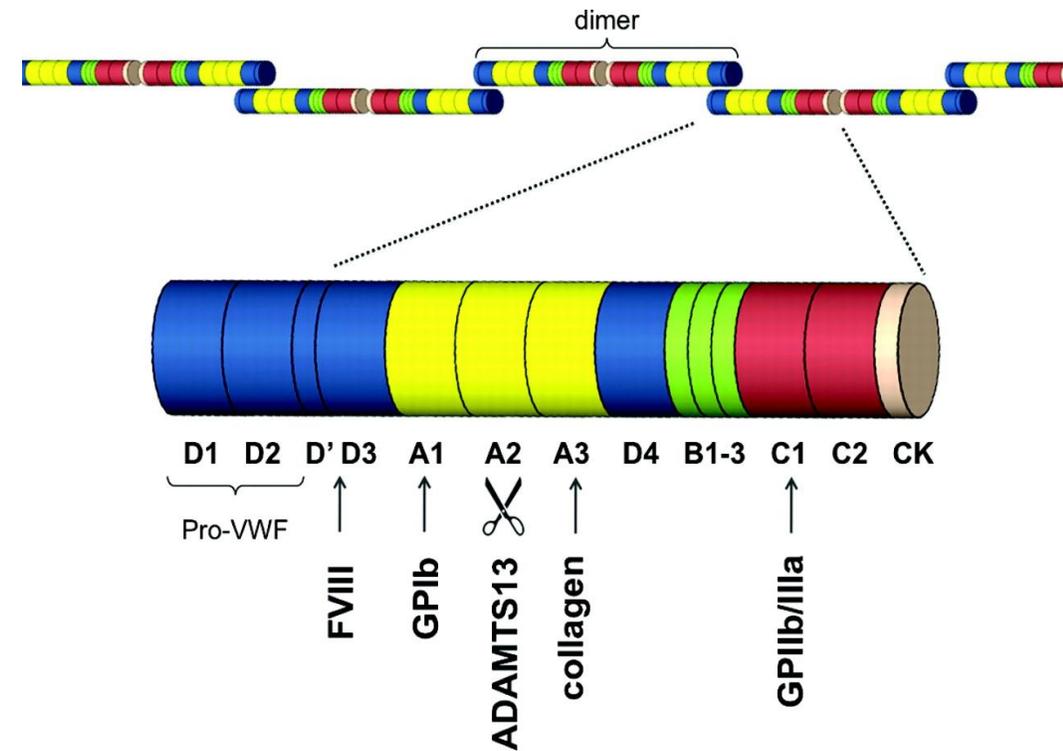
Nieves SANZ

Asesora Científica - SEBIA LATAM

nsanz@sebia.com

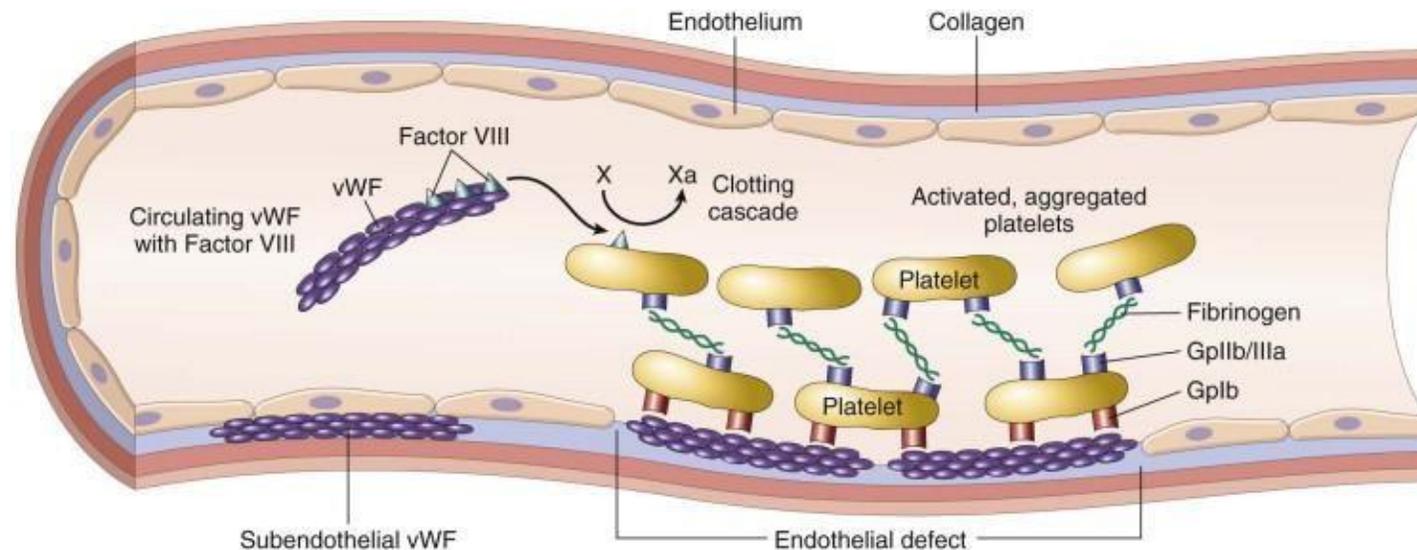
Factor de von Willebrand (FVW)

- El factor Von Willebrand (VWF) es una glicoproteína de gran tamaño, presente en el plasma humano, compuesta por una serie compleja de multímeros con pesos moleculares que varían de 800 a 20,000 kDa.
- El VWF se produce en las células endoteliales y en los megacariocitos (los precursores de las plaquetas) y se almacena en las plaquetas (gránulos α) hasta la activación de las plaquetas y su posterior liberación.



Factor de von Willebrand (FVW)

- El VWF es un componente crítico para la hemostasia y la formación de trombos.
- El VWF es esencialmente una proteína adhesiva que une las plaquetas a los sitios de lesión vascular y, por lo tanto, lleva sitios adhesivos para las plaquetas y los componentes de la matriz subendotelial como el colágeno.
- Además, el VWF es una molécula transportadora del factor VIII (FVIII), protegiéndolo de la degradación y aumentando, por lo tanto, su vida media plasmática.

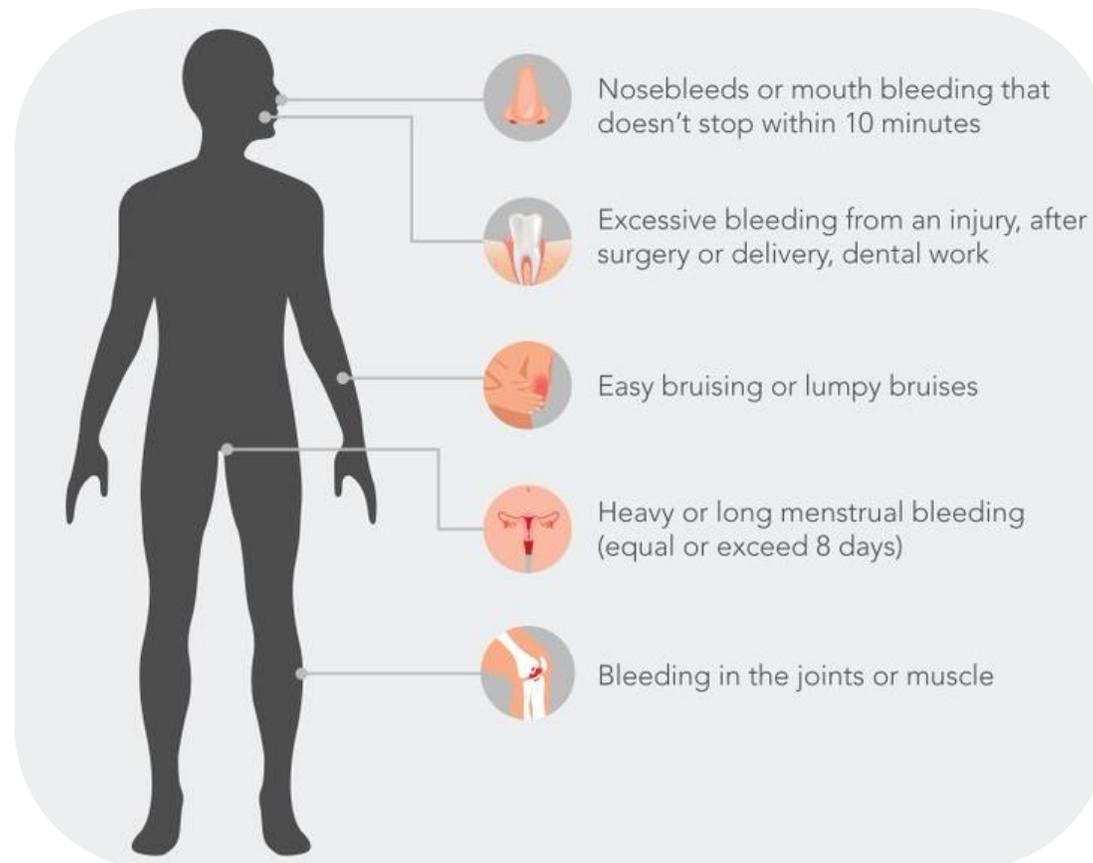


Enfermedad de von Willebrand (EVW)

- La enfermedad de von Willebrand (EVW) es una enfermedad congénita que se hereda y afecta a hombres y mujeres con casi la misma frecuencia.
- La EVW es causada por una deficiencia cualitativa o cuantitativa del factor von Willebrand (VWF) y se caracteriza por un riesgo de sangrado incrementado.
- Es el trastorno de la coagulación más común y afecta aproximadamente al 1% de la población mundial.
- Debido a que a menudo los síntomas son leves, una considerable mayoría de pacientes permanece sin diagnosticar.

Síntomas mas frecuentes de EVW

- Moretones con facilidad
- Sangrado prolongado por laceraciones
- Epistaxis
- Sangrado de las encías
- Menorragia
- Sangrado post-dental
- Sangrado post-quirúrgico
- Sangrado posparto excesivo
- Hematomas musculares (EVW tipo 3)
- Hemartrosis (EVW tipo 3)



Enfermedad de von Willebrand (EVW)

- VWD se ha clasificado en 3 categorías principales:

TIPO	DESCRIPCION	SANGRADO	PREVALENCIA
TIPO 1	Deficiencia cuantitativa parcial de VWF	Leve a moderado	75%
TIPO 2	Defectos cualitativos que afectan las funciones de VWF	Variable (generalmente moderado)	25 %
2A	Disminución de la adhesión plaquetaria (Gplba) por disminución selectiva de HMWM e IMWM		
2B	Aumento de la adhesión plaquetaria espontánea		
2M	Disminución de la adhesión plaquetaria sin disminución selectiva de HMWM		
2N	Disminución de la afinidad de unión de FVIII al FWV		
TIPO 3	Deficiencia cuantitativa total de VWF	Severo	1 en 1 millón

Enfermedad de von Willebrand (EVW)

- La EVW también puede surgir como un síndrome adquirido (SAVW), que puede representar hasta el 25% de los casos identificados como “EVW”.
- El síndrome adquirido de von Willebrand, es un trastorno hemorrágico raro, similar a la EVW, que ocurre cuando hay deficiencias en la concentración, estructura o función del VWF como resultado de afecciones adquiridas:
 - linfoproliferativa (leucemia linfocítica crónica),
 - mieloproliferativa (trombocitemia),
 - cardiovascular (estenosis aórtica),
 - inmunológico (hipotiroidismo)
 - raramente enfermedades autoinmunes o neoplásicas (tumores de Wilms),
 - uso de ciertos tratamientos (anticonvulsivos)

Diagnóstico de EVW

DIAGNOSTICO	PRUEBAS
1) Antecedentes personales y familiares de sangrado mucocutáneo excesivo	<ul style="list-style-type: none"> • Tipo y cronicidad • Momento de sangrado • Desencadenantes del sangrado (Cirugía, extracciones dentales ...) • Periodo menstrual / parto en mujeres
2) Pruebas de laboratorio para el screening	<ul style="list-style-type: none"> • Hemograma y recuento de plaquetas • Tiempo parcial de tromboplastina (PTT) • Tiempo de protrombina (PT) • Nivel de fibrinógeno o tiempo de trombina (TT) • Tiempo de sangrado (BT) • Prueba de función plaquetaria (PFA-100)
3) Pruebas de laboratorio para el diagnostico	<ul style="list-style-type: none"> • Actividad de coagulación del Factor VIII (Factor VIII: C) • Antígeno del factor von Willebrand (vWF: Ag) • Actividad cofactor de ristocetina (VWF: Rco) • Actividad de VWF (VWF: Rco / VWFAg)
4) Pruebas de laboratorio para la subtipificación	<ul style="list-style-type: none"> • Unión del FVW a colágeno (VWF: CB) • Unión del FVW a Gp1b • Multímeros de factor von Willebrand • Agregación de plaquetas inducida por ristocetina (RIPA) • Unión de factor VIII (unión de vWF: FVIII) • Prueba genética

Diagnóstico de EVW

	Tipo 1	Tipo 3	Tipo 2A	Tipo 2B	Tipo 2M	Tipo 2N
FVW: Ag	↓ o ↓↓	ausente (<0.05 U/mL)	↓	↓	↓	normal o ↓
FVW: RCo	↓ o ↓↓	ausente (<0.05 U/mL)	↓↓ o ↓↓↓	↓↓	↓↓	normal o ↓
FVIII:C	normal o ↓	0.01-0.10 U/mL	normal o ↓	normal o ↓	normal o ↓	↓↓ or ↓↓↓
Relación FVW: RCo/FVW:Ag	>0.6	no es útil	<0.6	<0.6	<0.6	>0.6
Multímeros	normal	ausente	pérdida de multímeros de alto peso molecular (y posiblemente también de peso intermedio)	pérdida de multímeros de alto peso molecular	normal	normal

Antígeno del factor von Willebrand

Actividad cofactor de ristocetina

Actividad de coagulación del Factor VIII

Actividad de VWF

↓: levemente reducido ↓↓: moderadamente reducido ↓↓↓: gravemente reducido

Tratamiento de EVW

- No existe cura para la enfermedad de von Willebrand pero el tratamiento y el monitoreo regular de la enfermedad permiten prevenir o limitar el riesgo de sangrado.

TIPO / SUBTIPO	TRATAMIENTO DE ELECCION
1	Desmopresina
2A	Concentrados de VWF/FVIII
2B	Concentrados de VWF/FVIII
2M	Concentrados de VWF/FVIII
2N	- Desmopresina (sangrado leve) - Concentrados de VWF/FVIII (procedimientos quirúrgicos)
3	Concentrados de VWF/FVIII

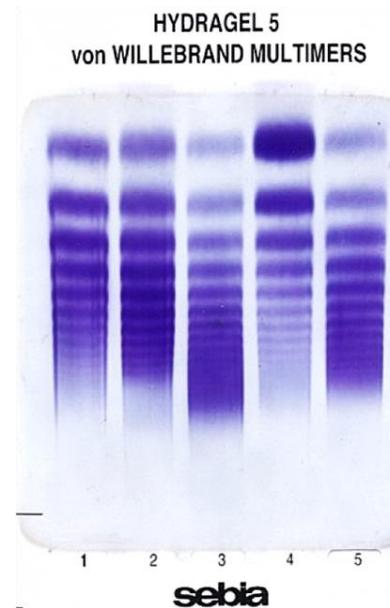
Análisis de multímeros de von Willebrand

- El análisis de multímeros de von Willebrand, es un ensayo cualitativo que permite evaluar la **distribución** y la **presencia** de los multímeros de von Willebrand.
- Es utilizado principalmente para caracterizar el subtipo de EVW.
- La prueba no se realiza ampliamente en los laboratorios de rutina debido a:
 - falta de estandarización del método → los geles y reactivos se preparan en el laboratorio
 - duración de la prueba → obtención de los resultados 2 semanas - 1 mes
 - necesidad de equipos especializados
 - variación de los resultados

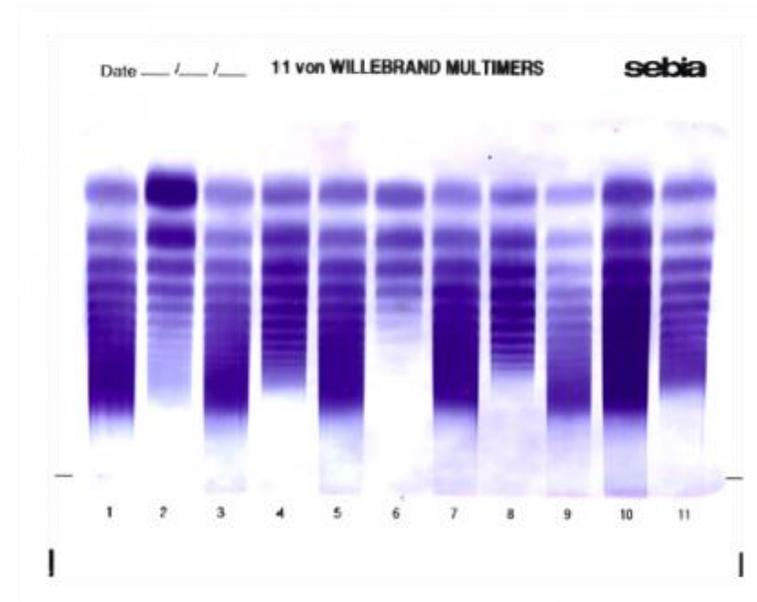
HYDRAGEL von WILLEBRAND MULTIMERS

- ✓ Más rápido (resultados en el mismo día!)
- ✓ Más fácil
- ✓ Reproducible
- ✓ Método semi-automático
- ✓ Se puede incluir junto con las pruebas de diagnóstico
- ✓ Fácil interpretación

HYDRAGEL 5
von WILLEBRAND MULTIMERS
Ref. 4359



HYDRAGEL 11
von WILLEBRAND MULTIMERS
Ref. 4360



HYDRAGEL von WILLEBRAND MULTIMERS

KIT HYDRAGEL

- Ref. 4359 (Hydragel 5)
- Ref. 4360 (Hydragel 11)



KIT DE REVELACION

Ref. 4747



HYDRAGEL von WILLEBRAND MULTIMERS

PESA METALICA

- Ref. 1652 (Hydragel 5)
- Ref. 1654 (Hydragel 11)



KIT MASCARAS

- Ref. 1651 (Hydragel 5)
- Ref. 1653 (Hydragel 11)



HYDRASYS 2



Hydrasys 2 / 2 Scan / 2 Scan Focusing

HYDRAGEL von WILLEBRAND MULTIMERS

Los geles de agarosa incluidos en el kit están destinados a la **separación de las proteínas plasmáticas en función de su peso molecular (PM)**.

- 1) Tratamiento de las muestras con ***dodecil sulfato de sodio (SDS)***
- 2) Aplicación de las muestras en el gel
- 3) Electroforesis en gel de agarosa para separar las proteínas del plasma en base a su PM
- 4) Inmunofijación de los multímeros con un antisuero específico ***anti-factor von Willebrand***
- 5) Revelación de los multímeros utilizando un ***anticuerpo marcado con peroxidasa***
- 6) Visualización de los multímeros utilizando ***solución de revelación TTF***

1. Tratamiento de las muestras

- El análisis se realiza con plasmas frescos recogidos en un anticoagulante que contenga citrato o EDTA.
- Los plasmas congelados son estables un máximo de 18 meses a - 70 / - 80 °C.
- **Dilución de las muestras utilizando el diluyente de muestra:**

Concentración del factor von Willebrand	Dilución	Diluyente de muestras (μL)	Plasma (μL)
< 20 %	1/4	30	10
Comprendida entre 20 y 150 %	1/6	50	10
Comprendida entre 150 y 300 %	1/10	90	10
> 300 %	1/20	95	5
Concentración desconocida	1/6	50	10

- Incubar durante exactamente 20 minutos a 45 °C en baño termostático.

Control de calidad



von Willebrand Factor Normal Reference Plasma



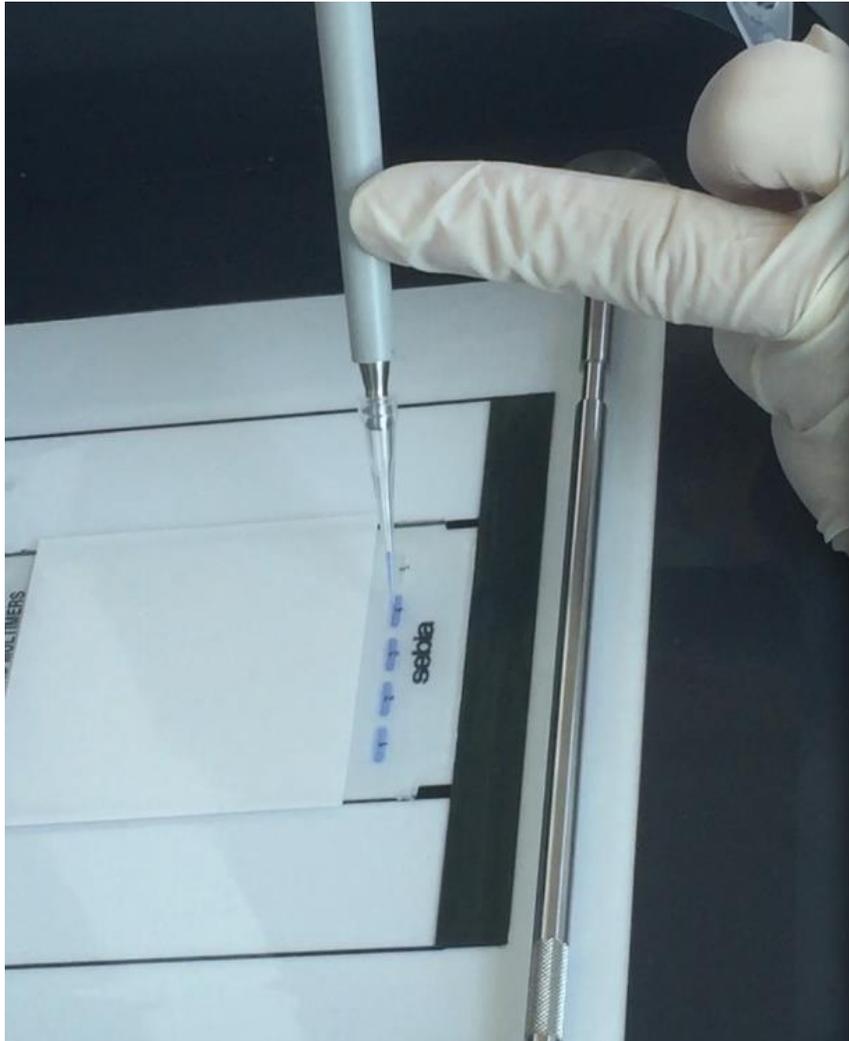
Reconstitución:

- 1) Reconstituir el vial liofilizado con 0,5 ml de agua destilada.
- 2) Hacer alícuotas de 20 μ L en microtubos con tapa a rosca
- 3) Almacenar las alícuotas a -80° C

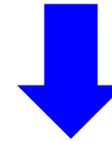
USO: Diluir el control de calidad 1/6 con el diluyente de muestra.



2. Aplicación de las muestras y el control



Aplicar 5 μ L/pocillo de control o muestra

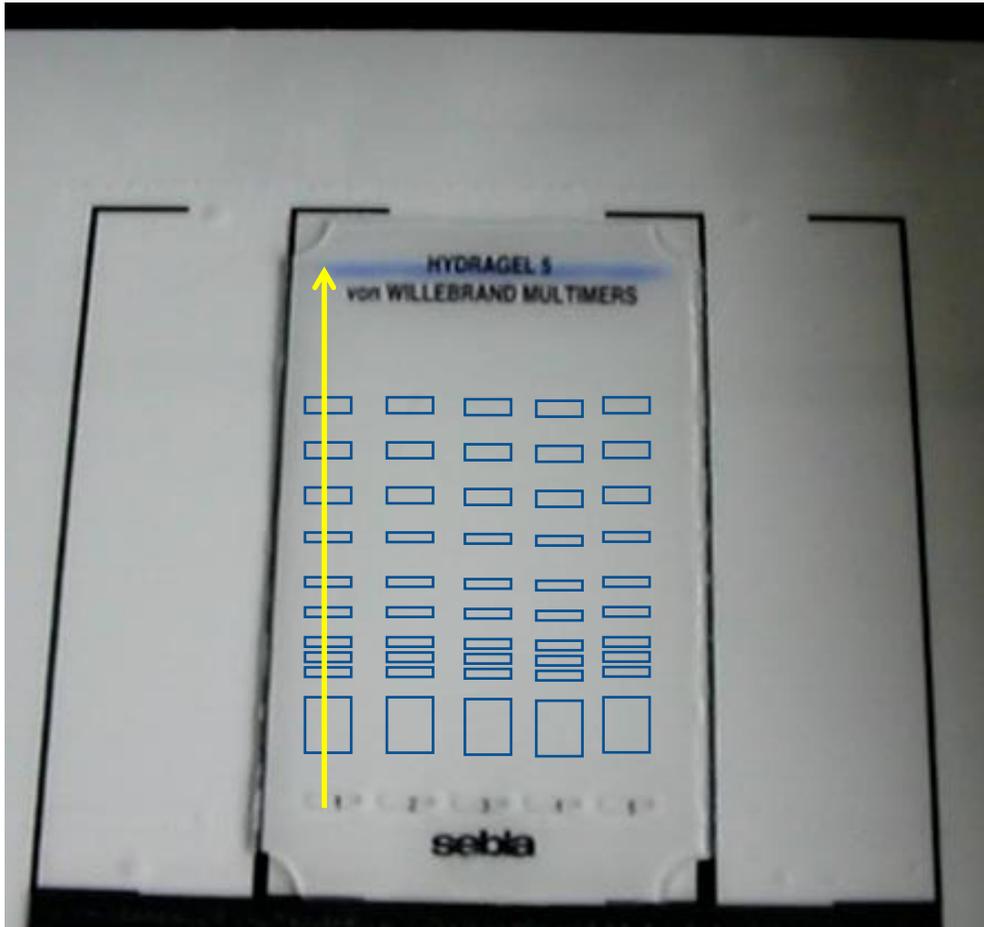


PASO CRITICO

- Utilice pipeteo inverso
- NO aplique muestra fuera del pocillo
- EVITE las burbujas
- NO toque los bordes del pocillo
- NO perfore los pocillos

3. Electroforesis

- Las proteínas plasmáticas son separadas de acuerdo a su peso molecular:



➤ **Multímeros pequeños**

Pasan fácilmente a través de la matriz de la agarosa y migran alejados del punto de aplicación.

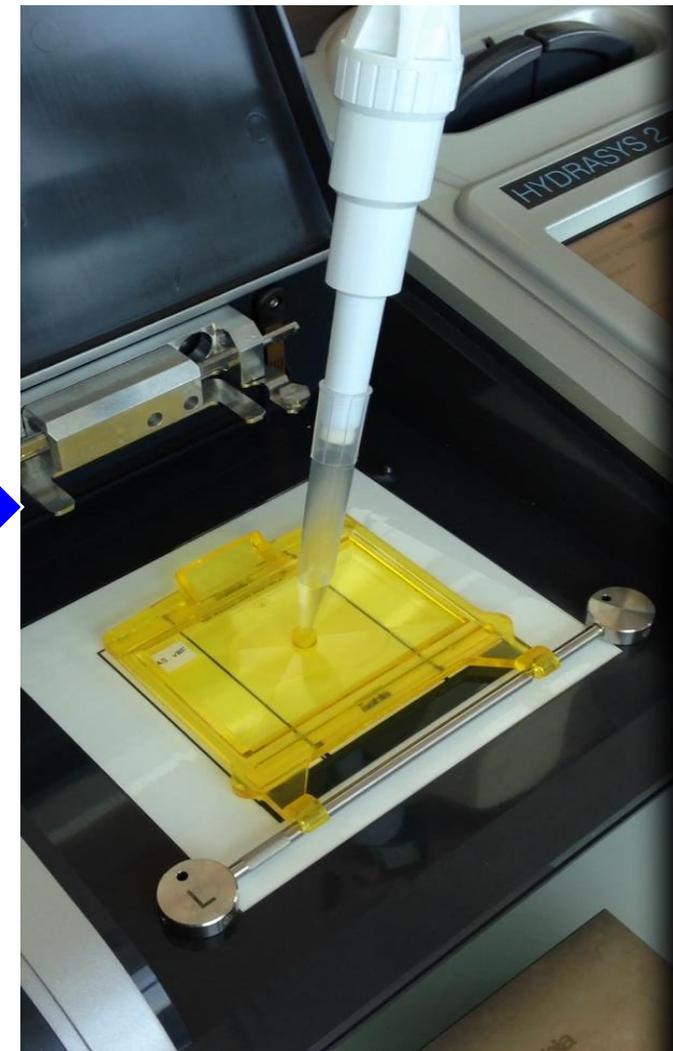
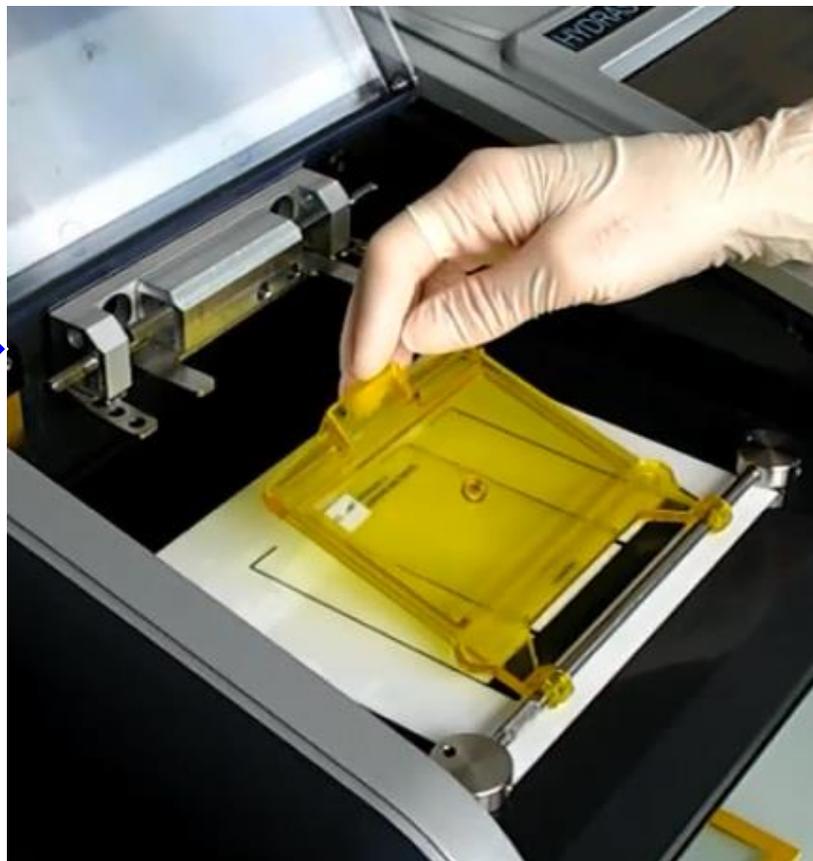
➤ **Multímeros grandes**

No migran muy alejados del punto de aplicación debido a su gran tamaño.

4. Inmunofijacion con anti-vWF

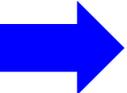
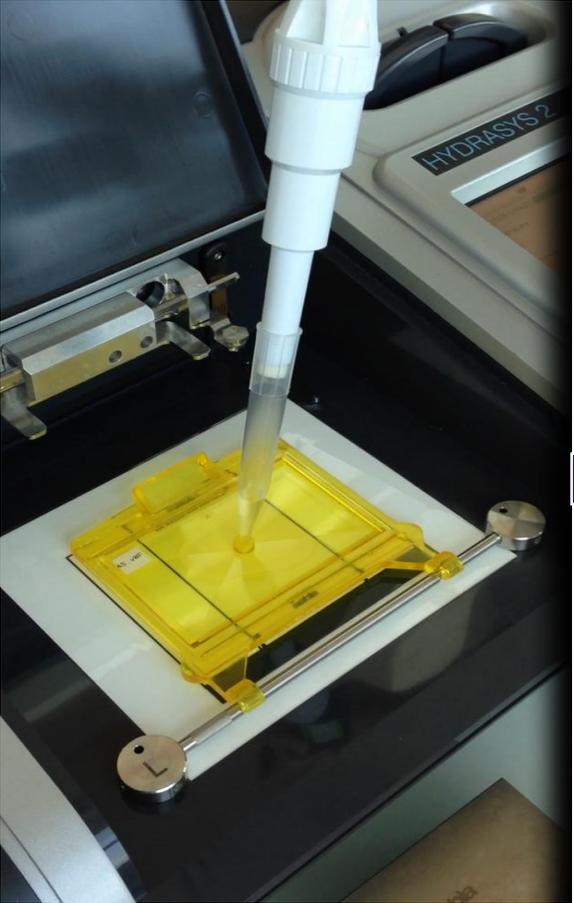


Diluyente de antisuero
+
Antisuero anti-vWF

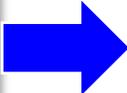
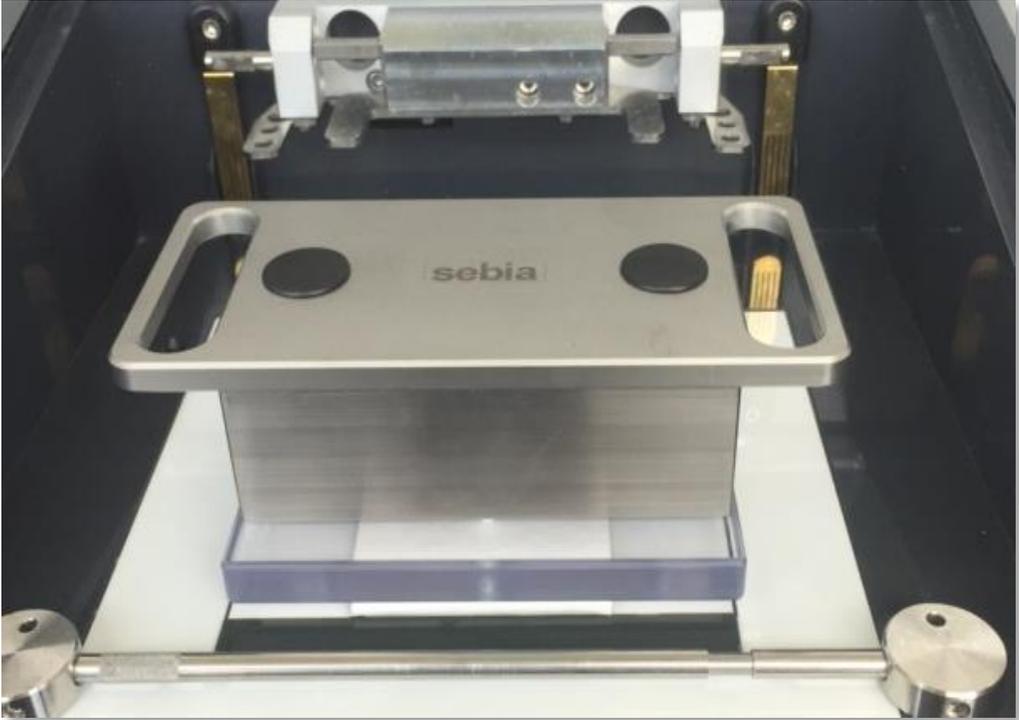


Etapas intermedias

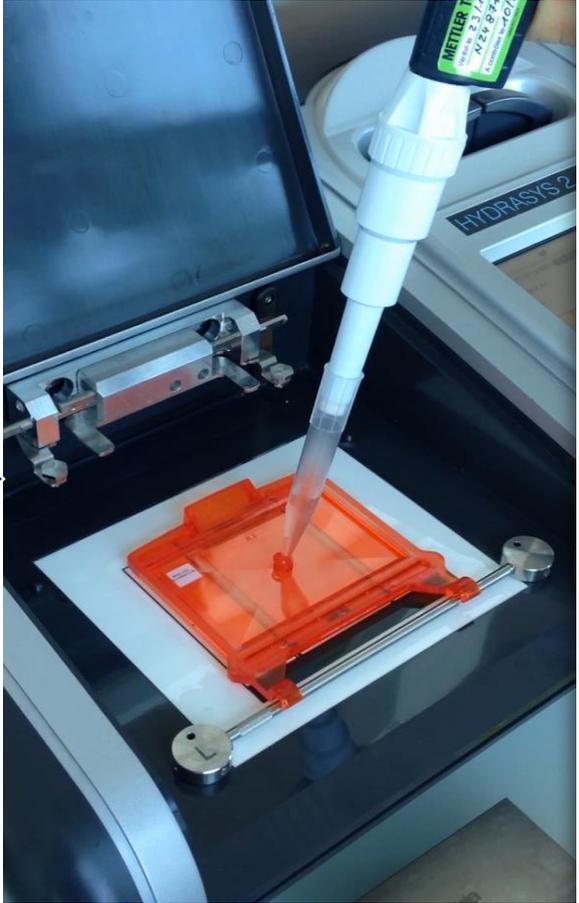
Eliminacion del antisuero



Blotting



Lavado del gel



Papel filtro fino

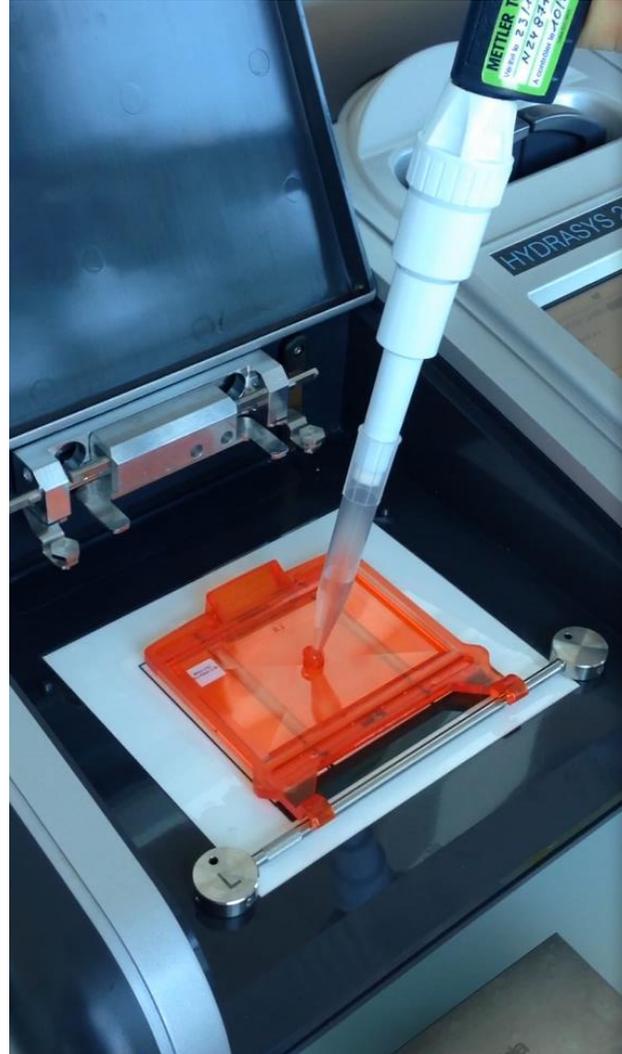
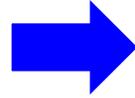


Papel filtro grueso



Pesa

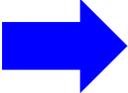
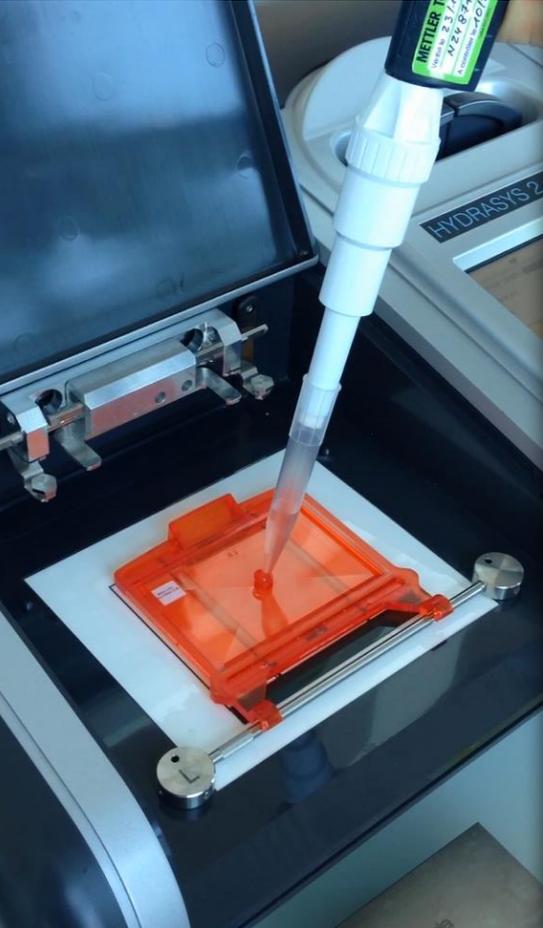
5. Inmunofijacion con anti-IgG-PER



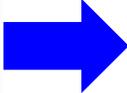
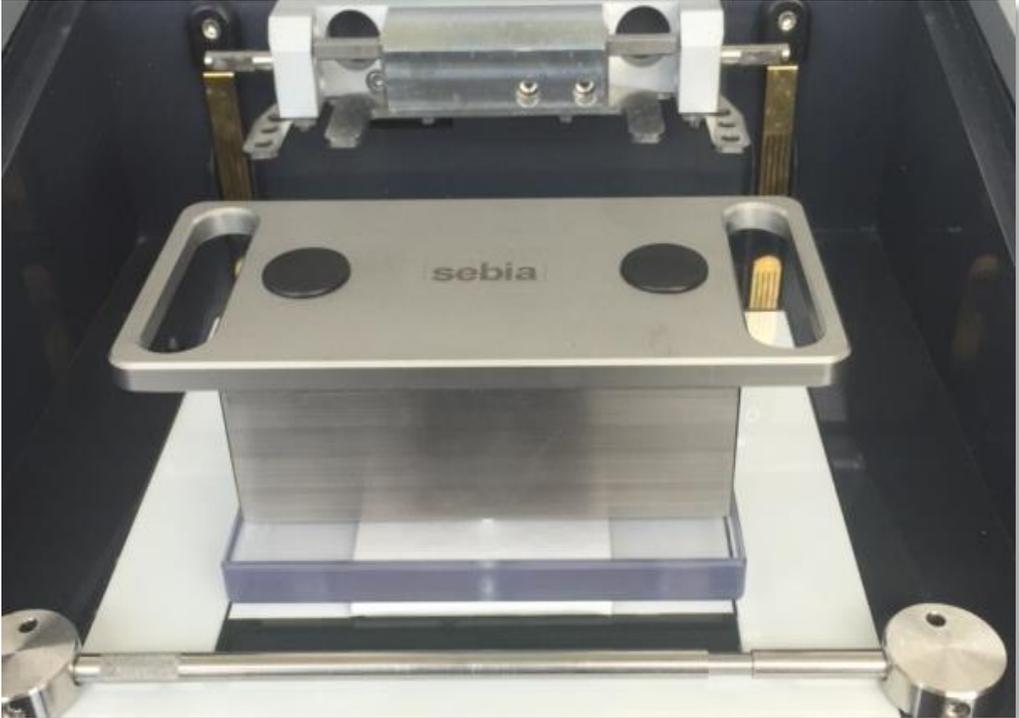
Diluyente de antisuero
+
Antisuero anti-IgG-PER

Etapas intermedias

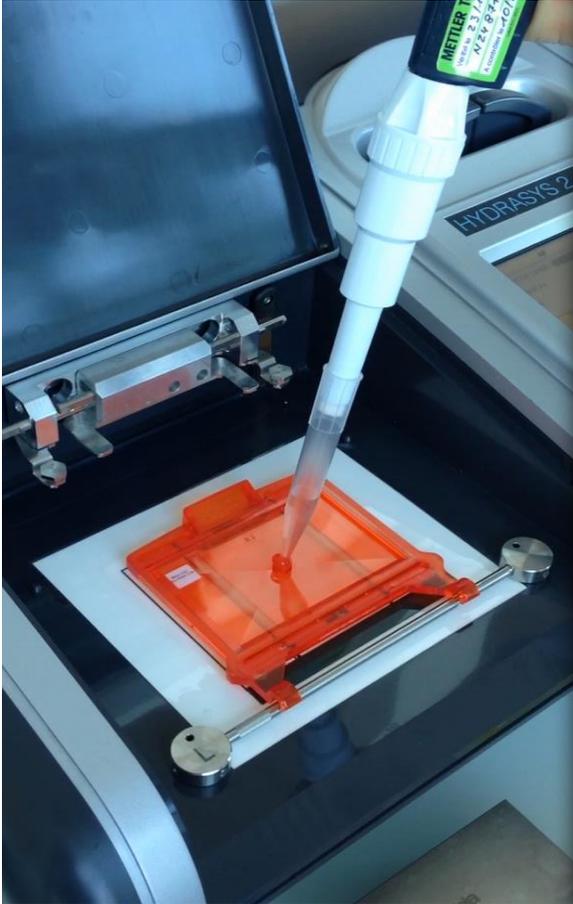
Eliminacion del antisuero



Blotting



Lavado del gel

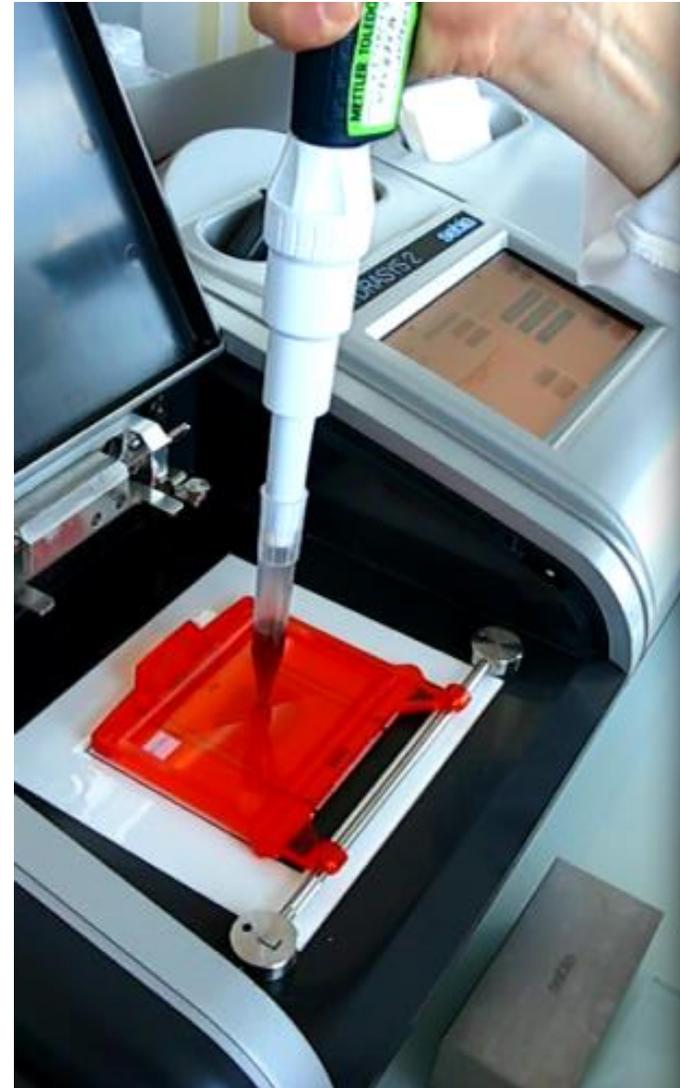
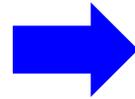


Papel filtro fino

Papel filtro grueso

Pesa

6. Visualización de los multimeros de von Willebrand



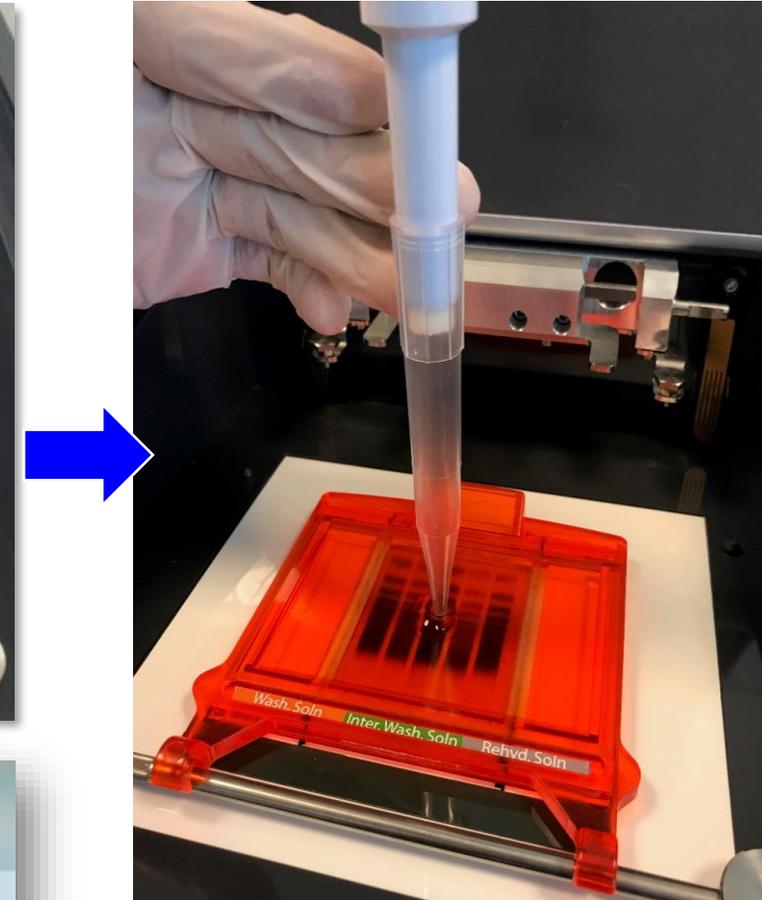
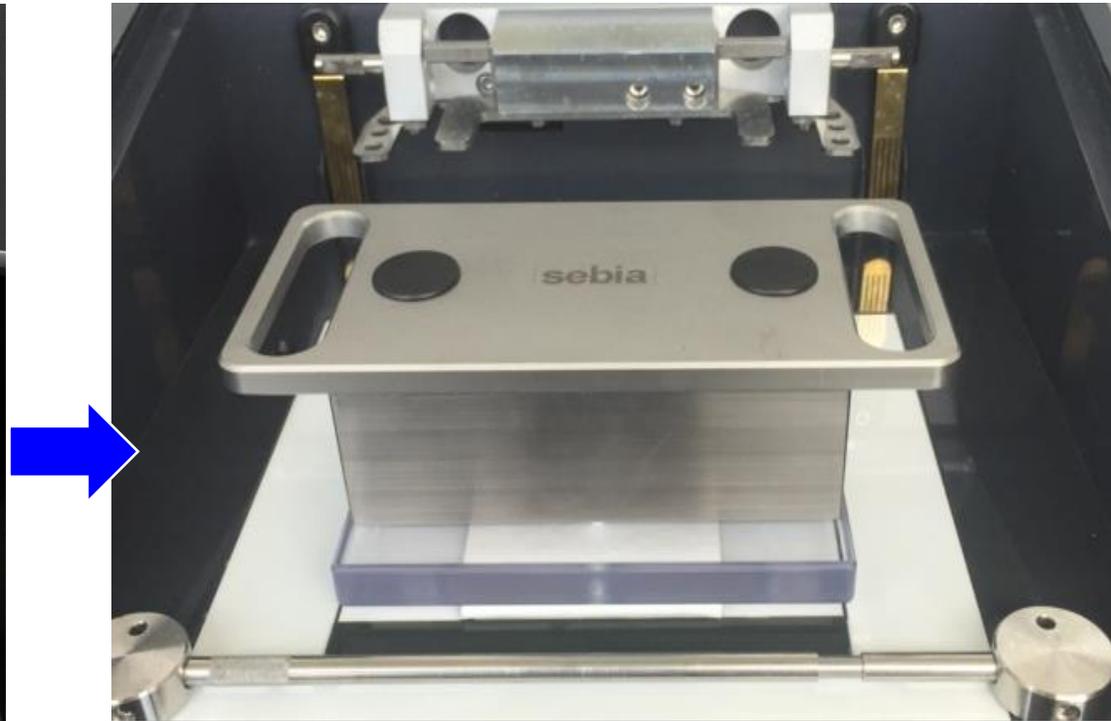
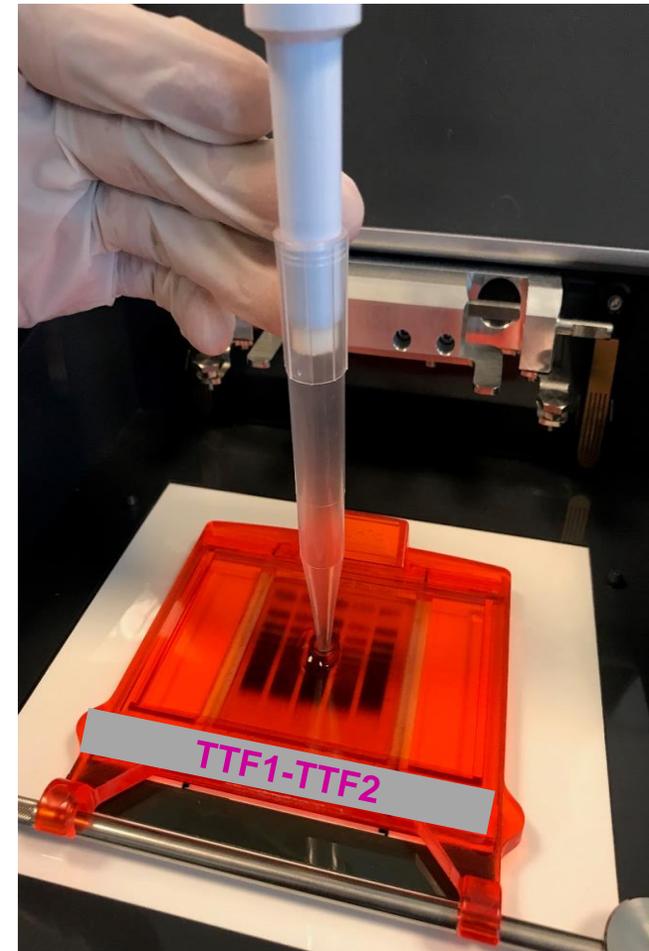
Solvente TTF
+
TTF1 + TTF2 + H₂O₂ (30%)

Etapas intermedias

Eliminación de la
solucion de revelación

Blotting

Lavado del gel



+



+

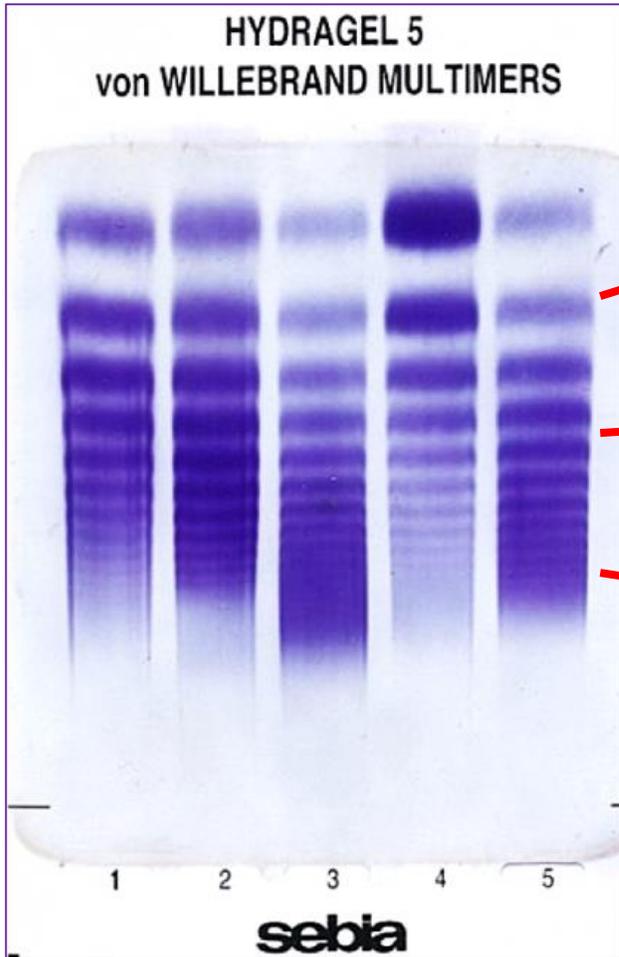


Papel filtro fino

Papel filtro grueso

Pesa

Resultado



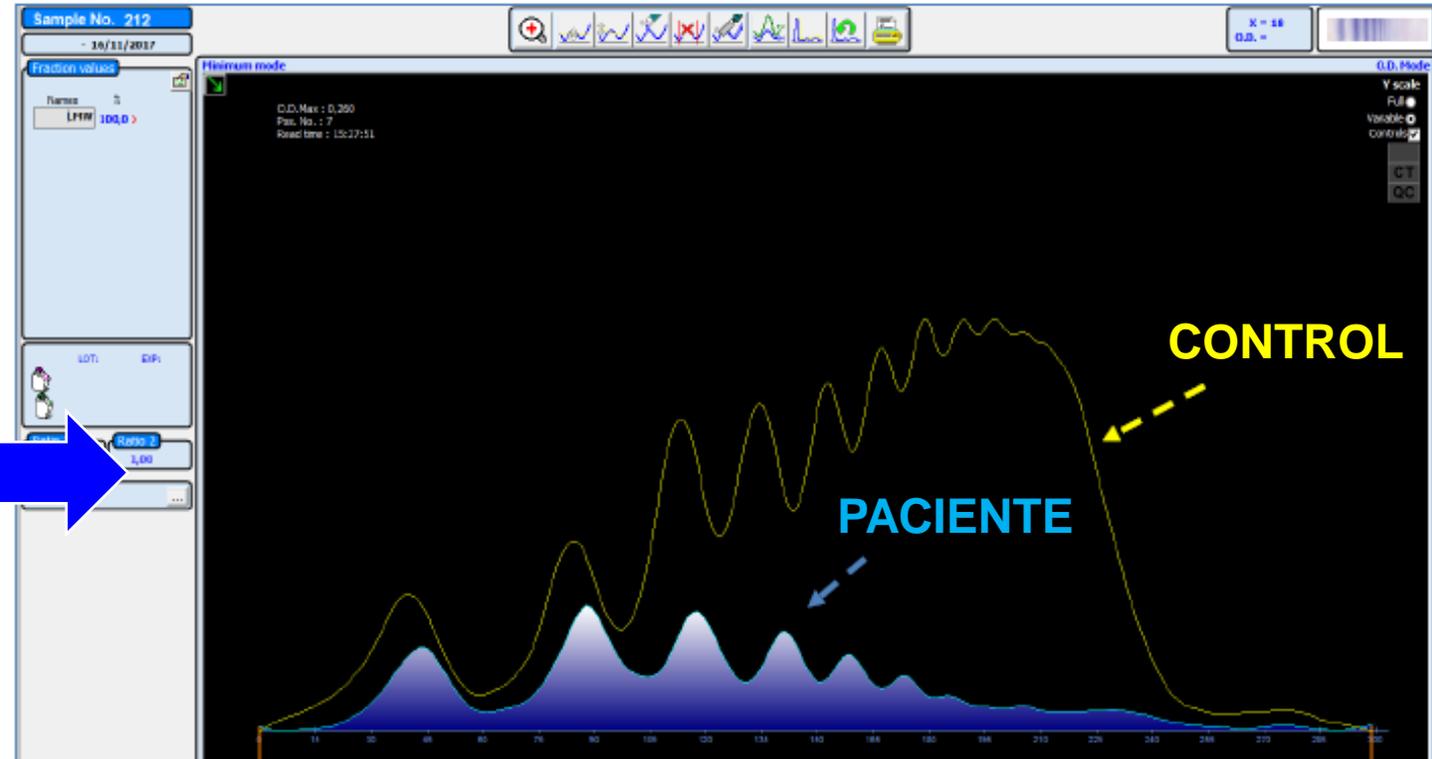
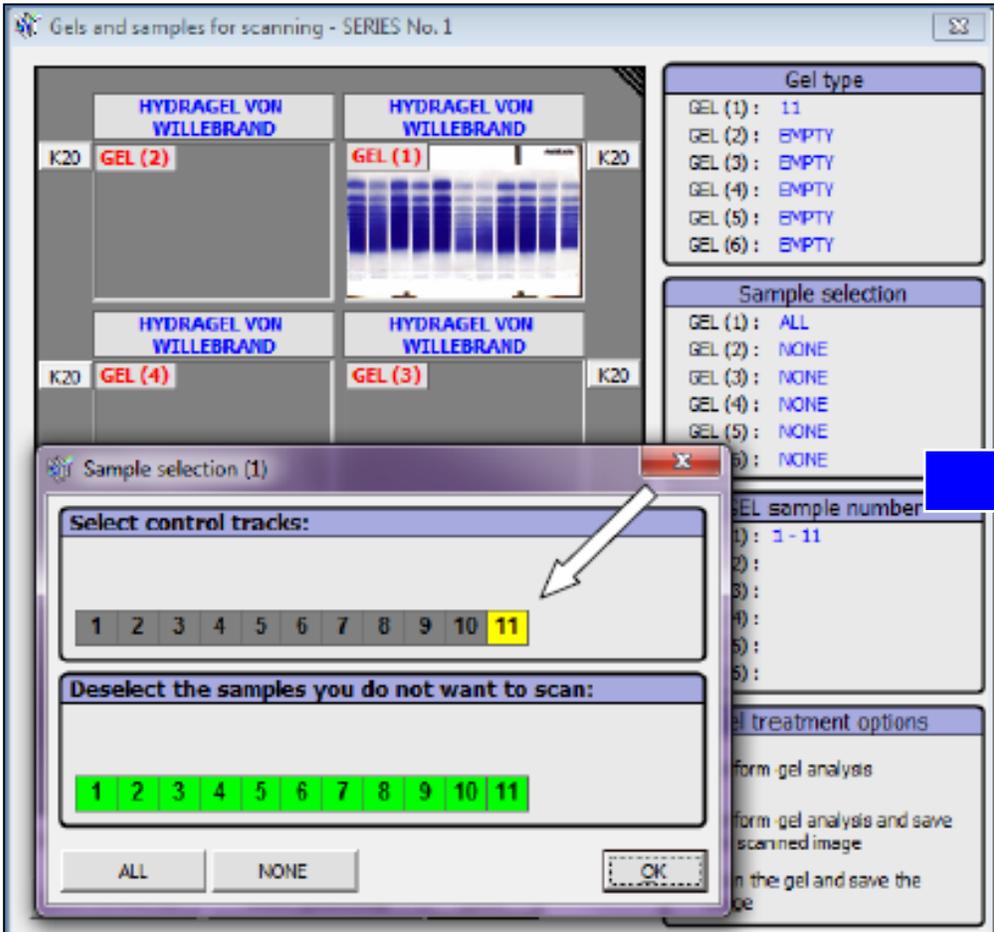
Multímeros de bajo peso molecular (LMWM)

Multímeros de peso molecular intermedio (IMWM)

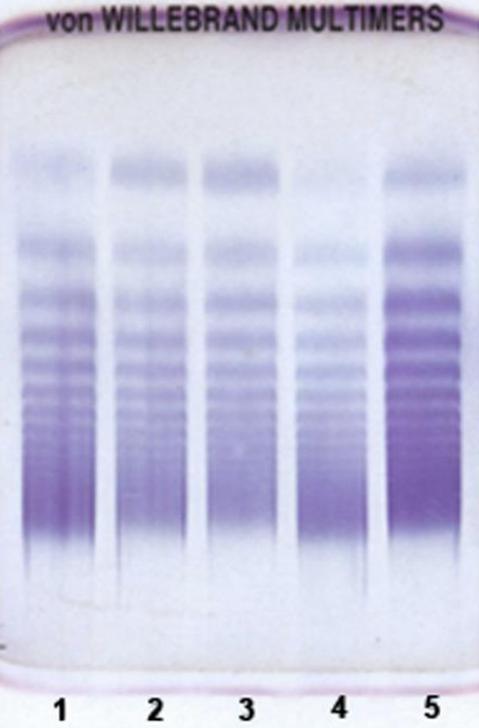
Multímeros de alto peso molecular (HMWM)

Escaneo del gel

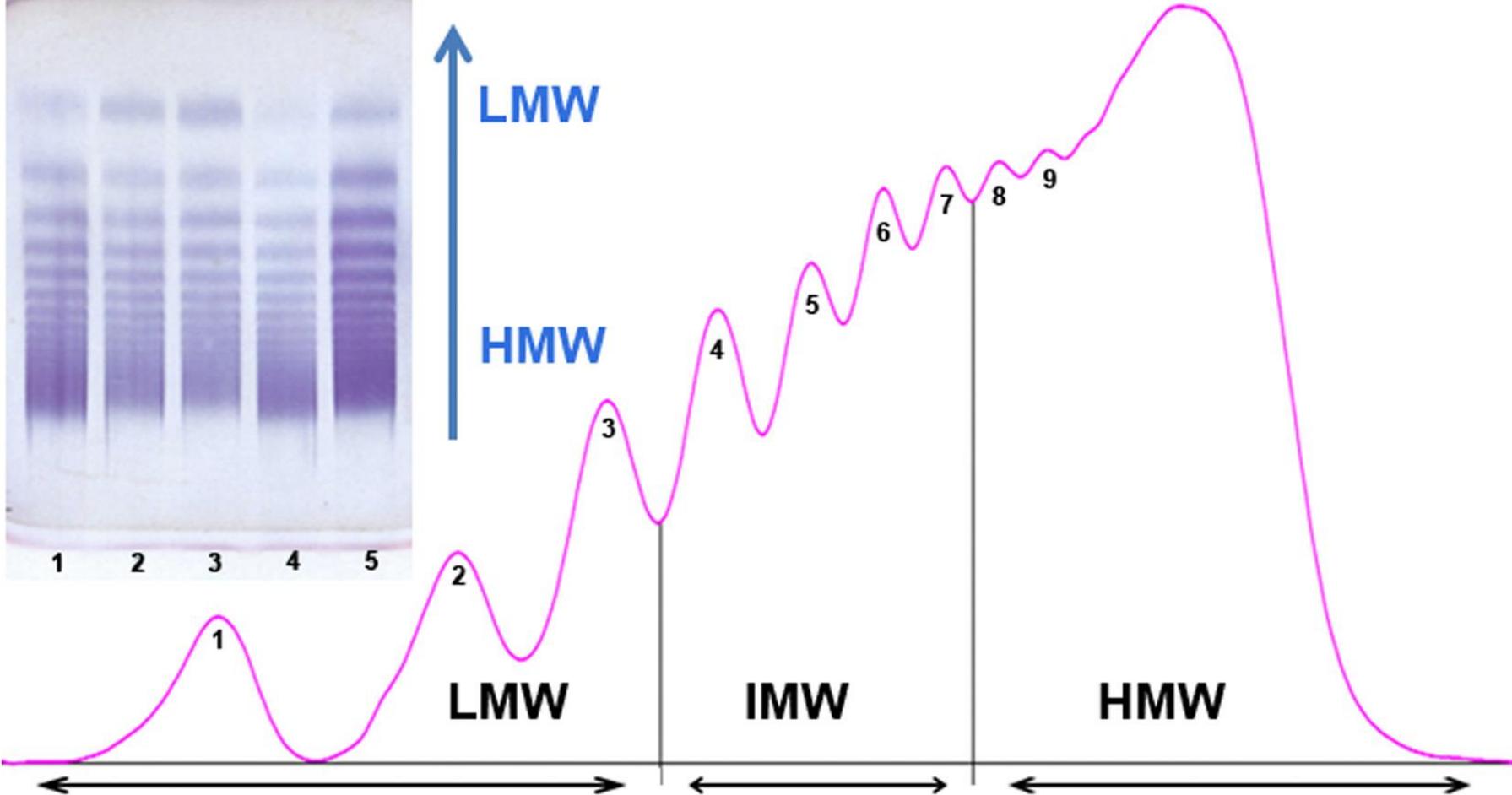
- Programa de lectura: HYDRAGEL VON WILLEBRAND
- Seleccionar tamaño del gel (click izquierdo)
- Seleccionar la posición del control de calidad (click derecho)



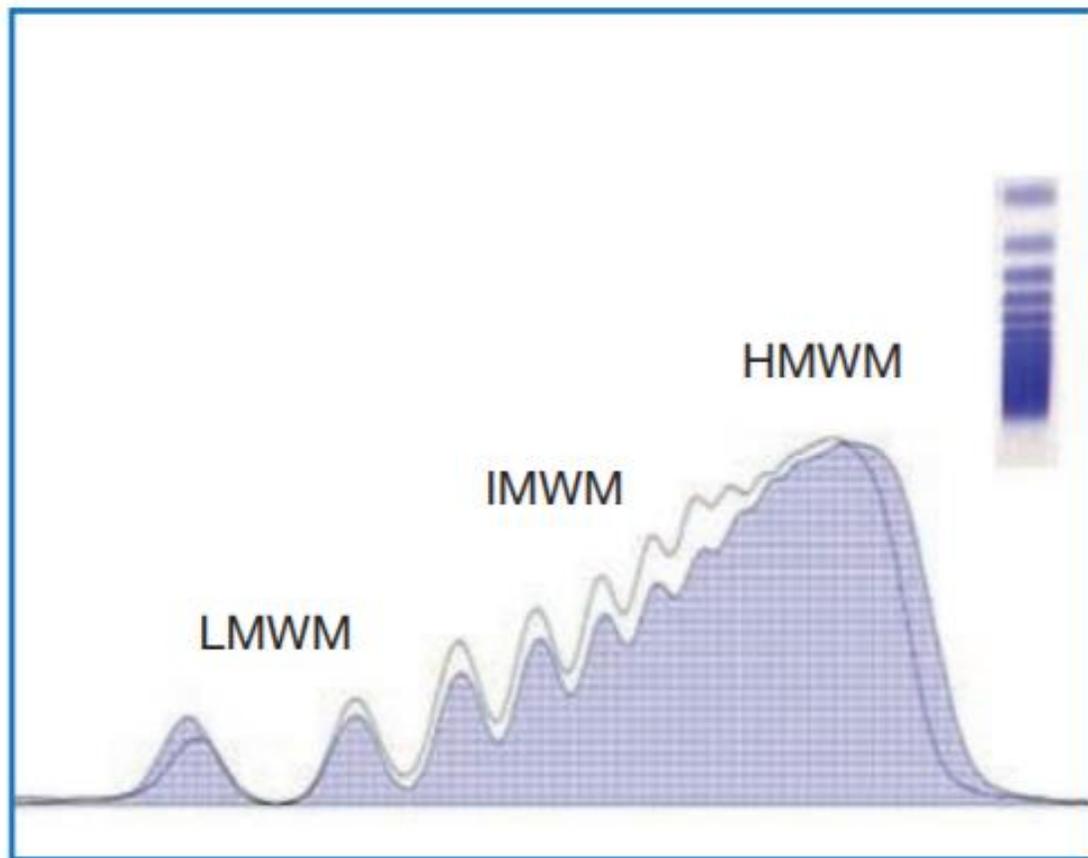
Plasma normal



↑ LMW
HMW

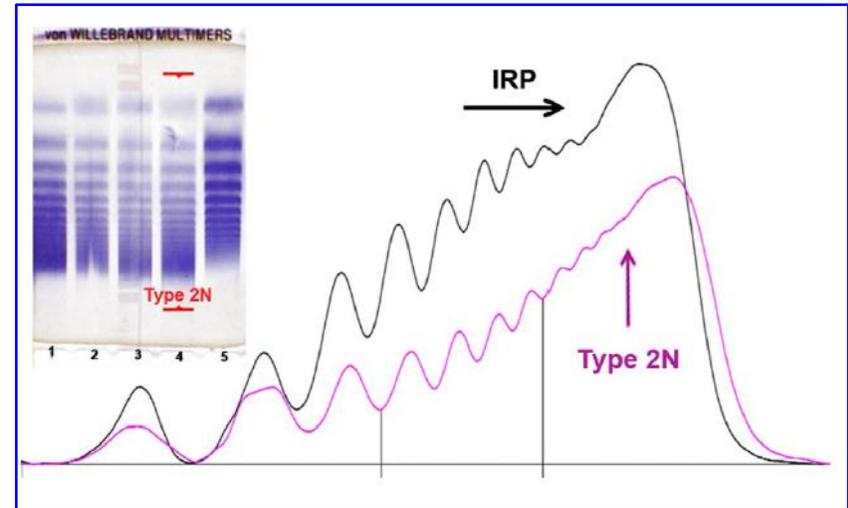
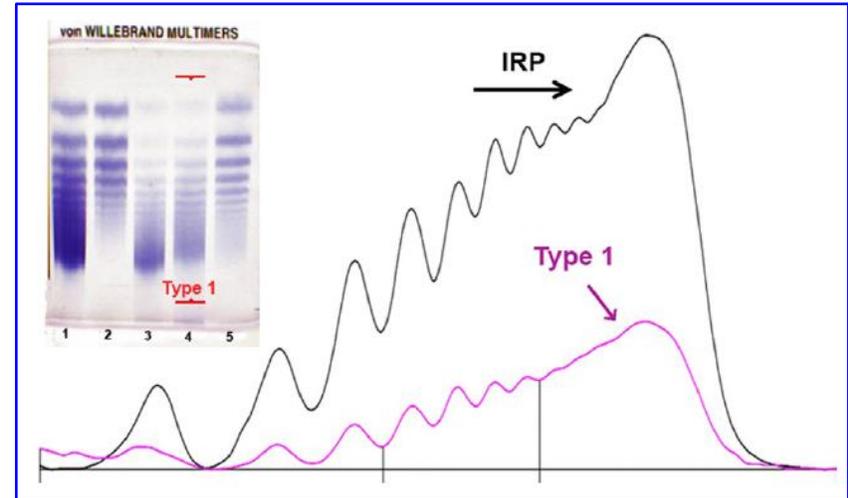
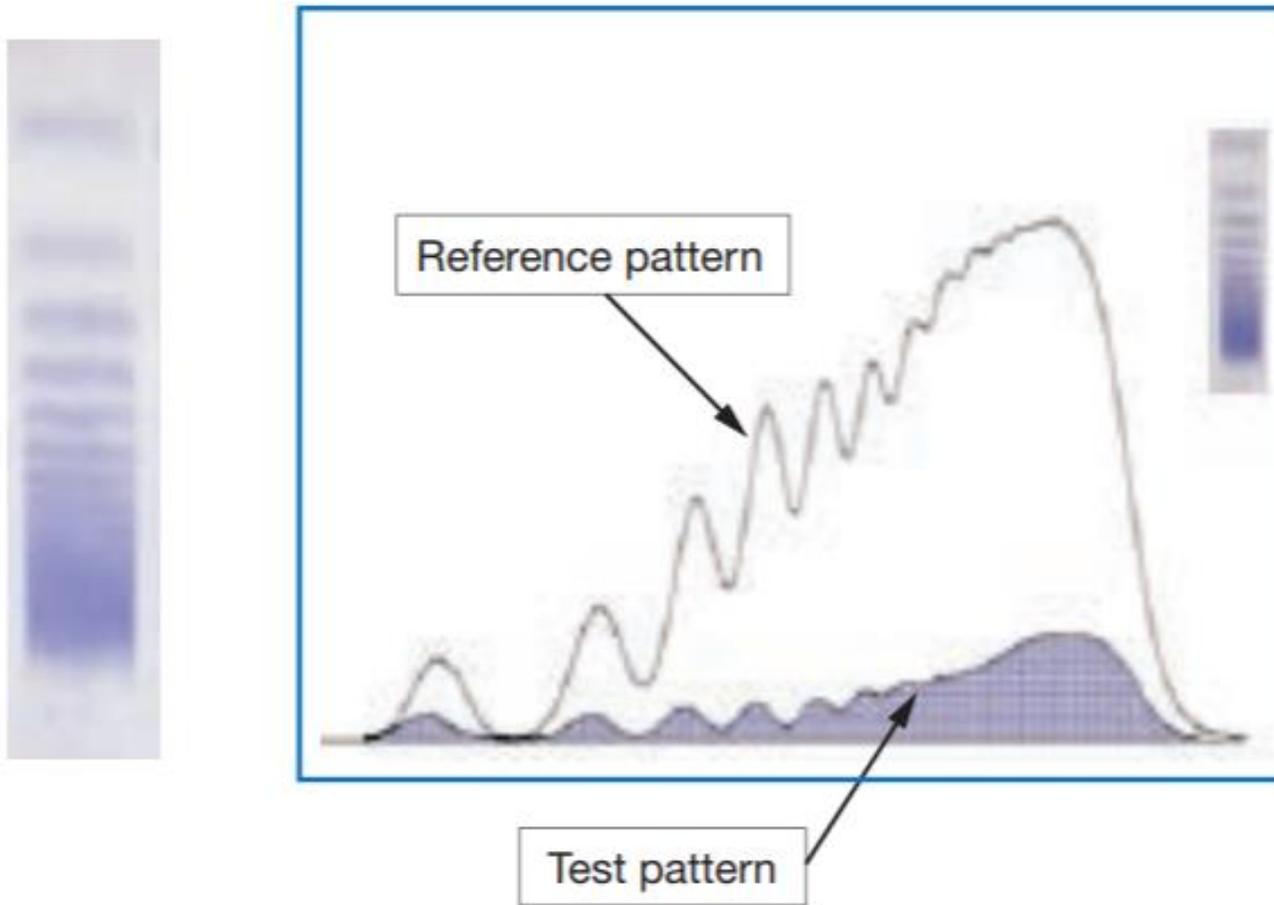


CASO 1



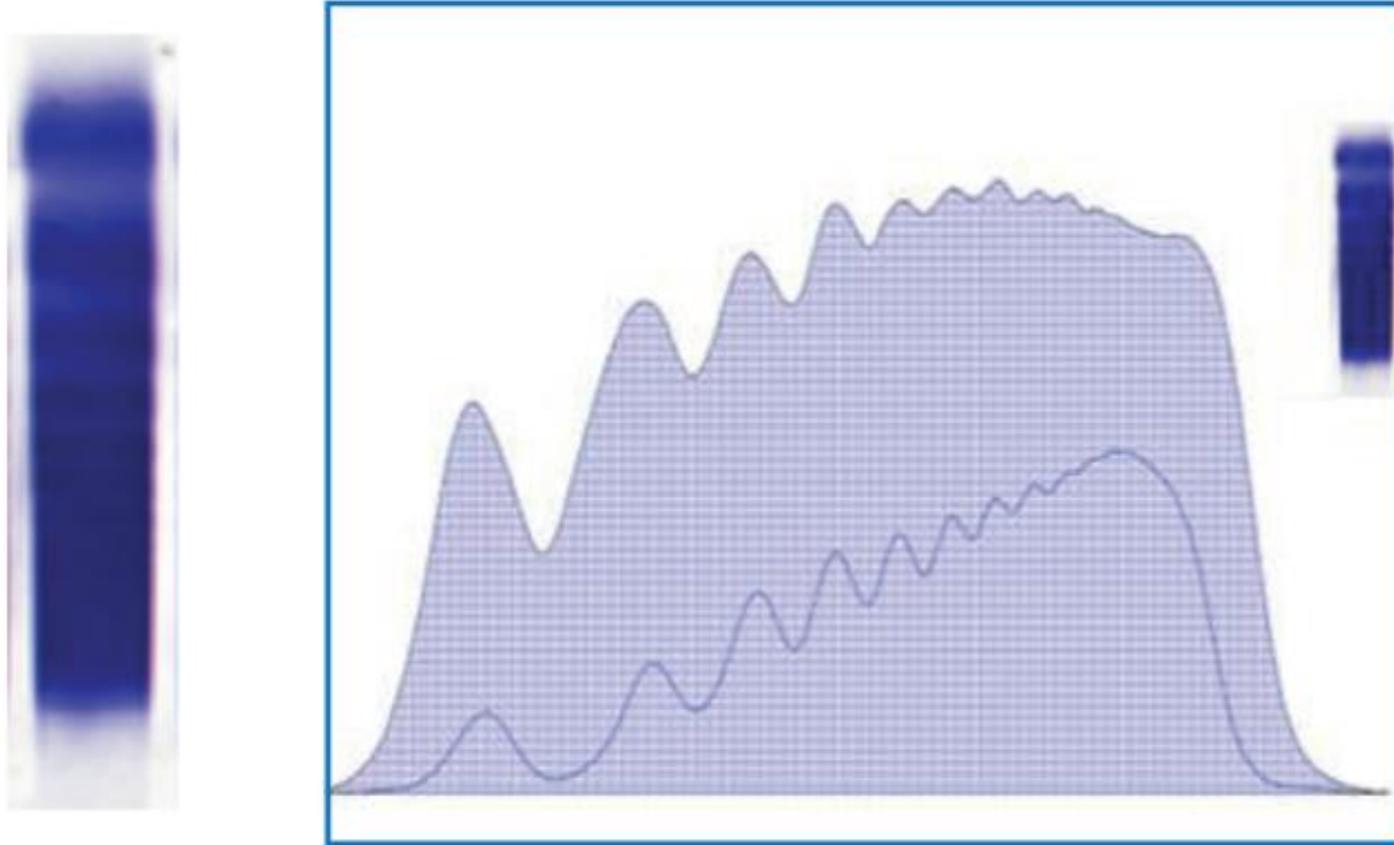
CONCLUSION: Distribución normal de los multímeros.
Presencia de LMWM, IMWM y HMWM en proporciones e intensidades equivalentes a las del perfil de referencia.

CASO 2



CONCLUSION: Distribución normal de los multímeros.
Presencia de LMWM, IMWM y HMWM con intensidades inferiores a las del perfil de referencia.

CASO 3

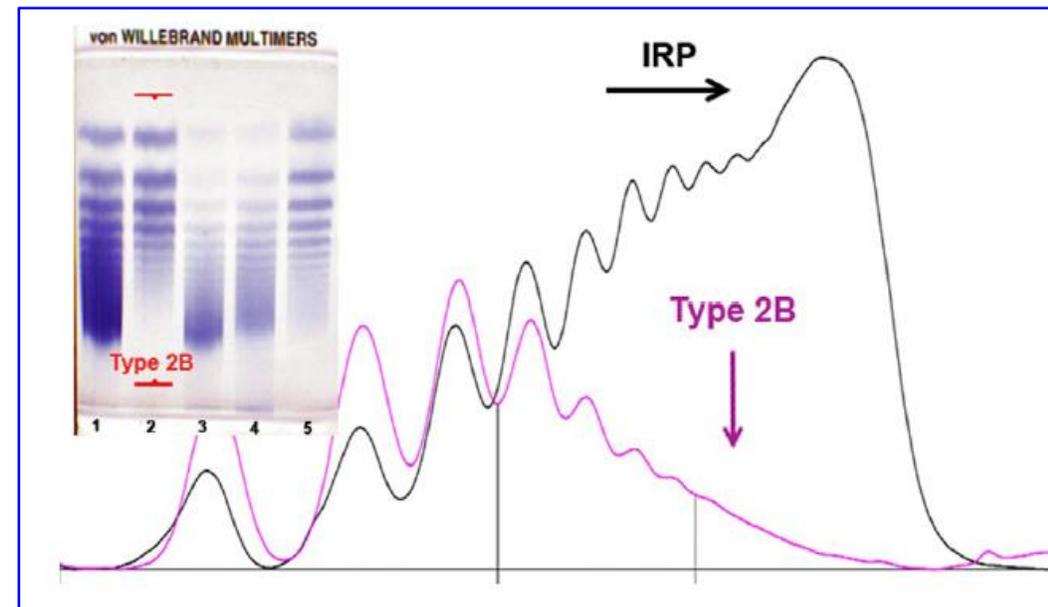
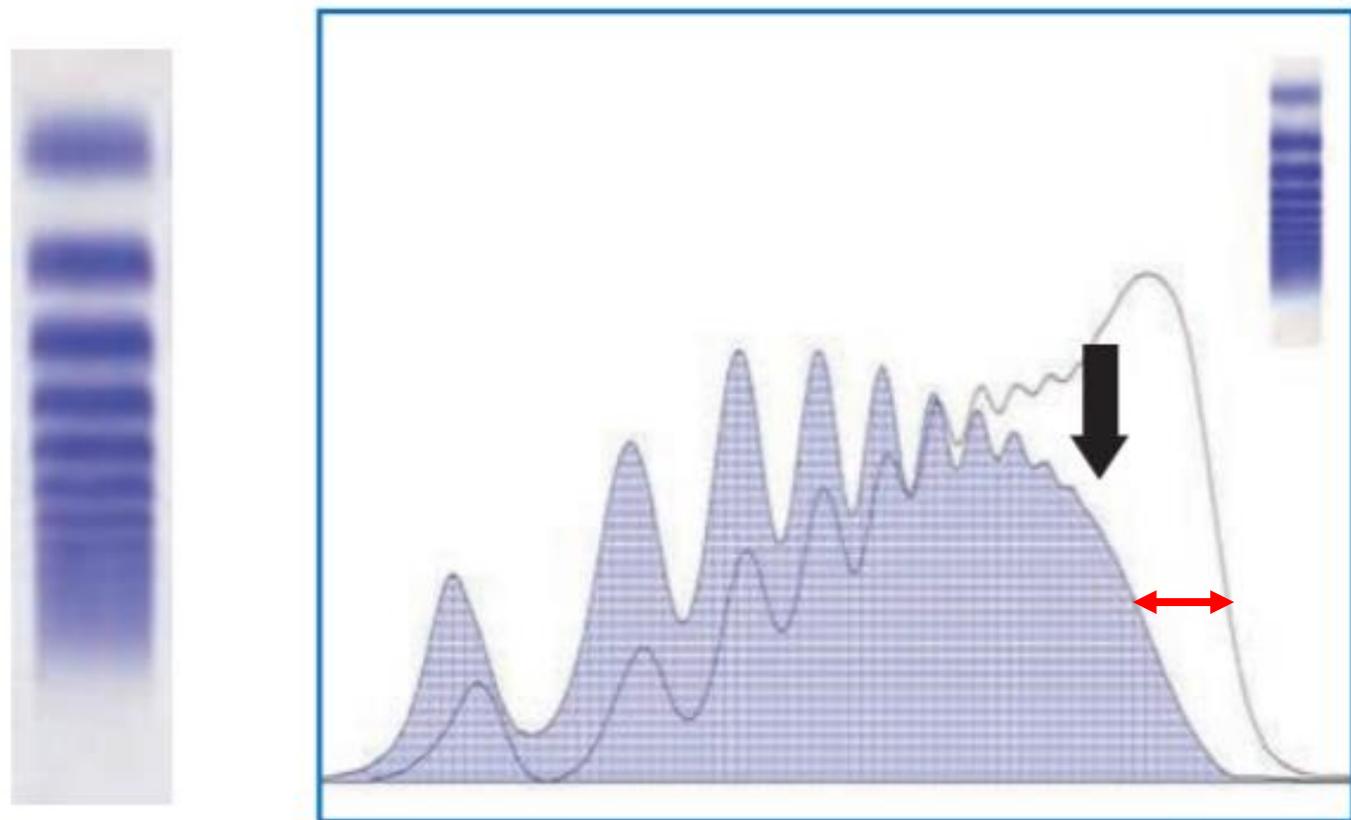


CONCLUSION: Distribución normal de los multímeros.
Presencia de LMWM, IMWM y HMWM con intensidades superiores a las del perfil de referencia.



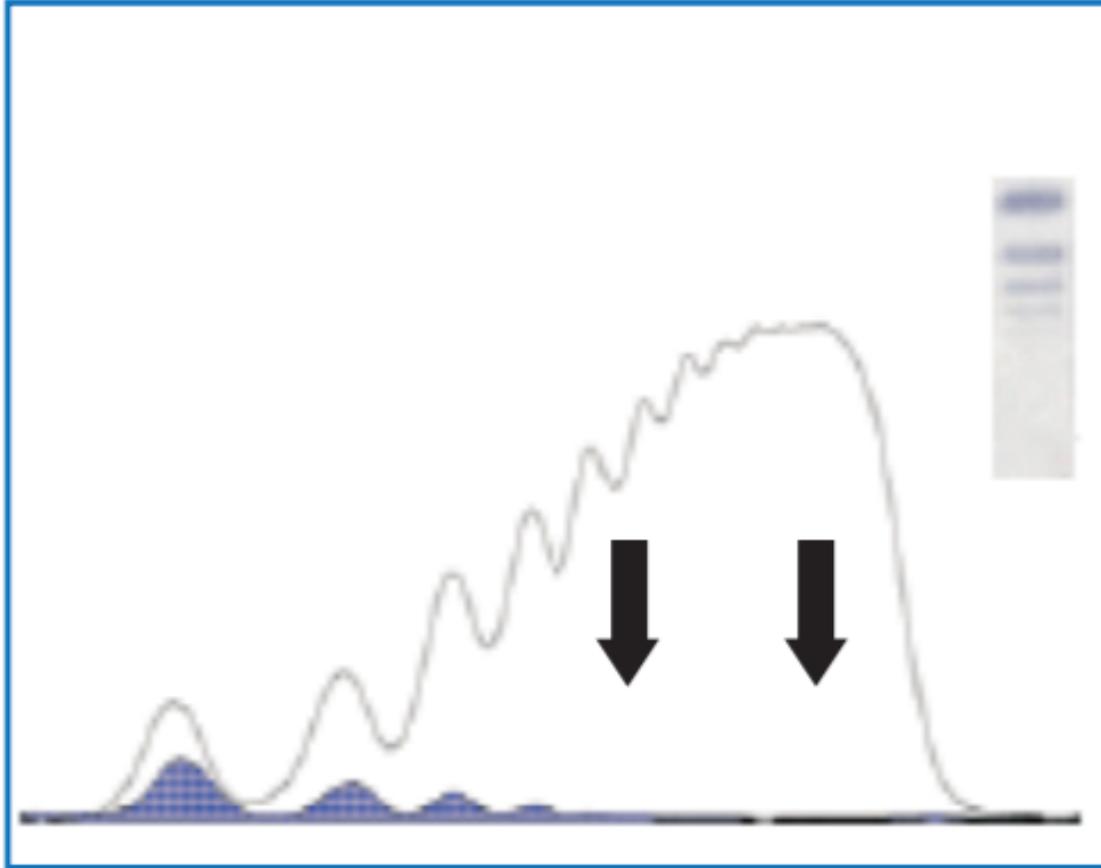
Se recomienda diluir la muestra para obtener una mejor separación de las fracciones para la interpretación del perfil.

CASO 4



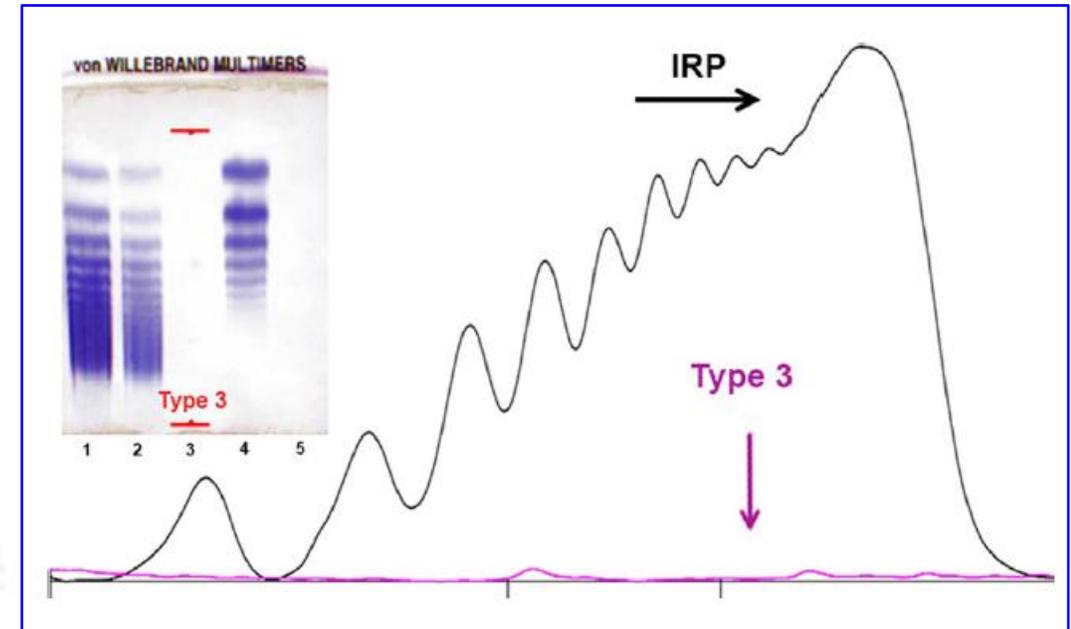
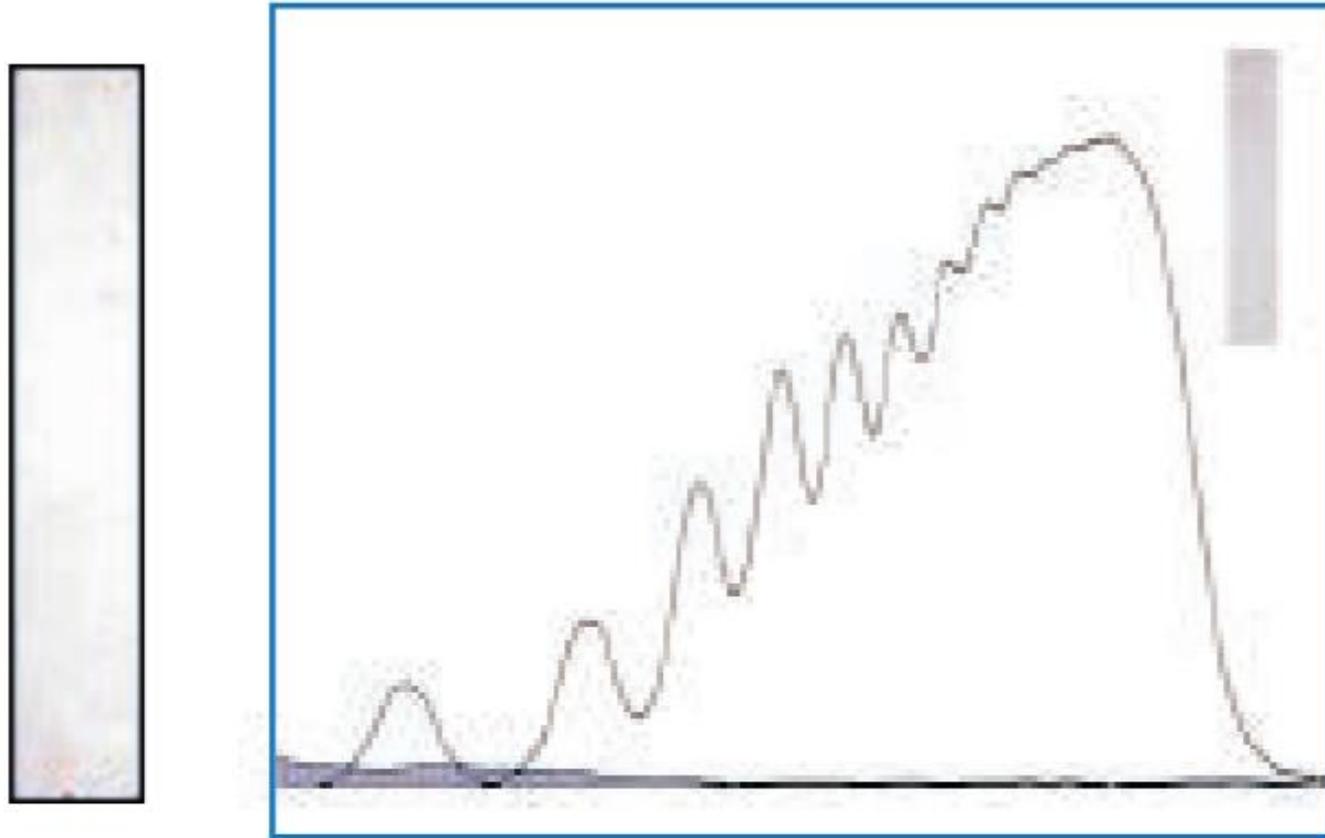
CONCLUSION: Distribución anormal de los multímeros.
Pérdida de HMWM.

CASO 5



CONCLUSION: Distribución anormal de los multímeros.
Pérdida de HMW e IMW.

CASO 6



CONCLUSION: Distribución anormal de los multímeros.
Ausencia de todos los multimeros.

FLUJO DE TRABAJO

PASO	ETAPA	DURACION	OBSERVACIONES
1	Pre-migración	5 min	
2	Migración	1h 45min	
3	1° inmunofijación	1h	60µL Anti-vWF + 2,5 mL diluyente de AS = 2,5 mL
4	Eliminar AS		
5	Blotting	10 min	Papel fino + papel grueso + pesa
6	Lavado	20 min	4,5 mL Solución de lavado
7	Eliminación solución lavado		
8	Blotting	10 min	Papel fino + papel grueso + pesa
9	Lavado intermedio	10 min	4,5 mL Solución de lavado intermedio
10	Eliminación sn lavado intermedio		
11	Blotting	5 segs	Papel fino
12	2° inmunofijación	30 min	2µL Anti-IgG-PER + 4 mL diluyente de AS = Hasta cubrir el gel
13	Eliminación anticuerpo		
14	Blotting	10 min	Papel fino + papel grueso + pesa
15	Lavado	20 min	4,5 mL Solución de lavado
16	Eliminación sn lavado		
17	Blotting	10 min	Papel fino + papel grueso + pesa
18	1° Rehidratación	10 min	4,5 mL Solución rehidratante
19	Eliminación sn rehidratante		
20	Blotting	10 min	Papel fino + papel grueso + pesa
21	2° Rehidratación	10 min	4,5 mL Solución rehidratante
22	Eliminación sn rehidratante		Aplicar rápidamente la solución de revelado
23	Revelación	10 min	3 mL solvente 75 µL TTF1 75 µL TTF2 → Aplicar volumen hasta cubrir el gel 3 µL H2O2 30%
24	Eliminación sn revelado		
25	blotting	5 min	Papel fino + papel grueso + pesa
26	3° Rehidratación	5 min	4,5 mL Solución rehidratante
27	Eliminación sn rehidratante		
28	Blotting	5 min	Papel fino + papel grueso + pesa
29	Secado	10 min	
30	Lavado		Lavar la cubeta previamente
31	Lectura		

Preparar IgG-PER

Colocar TTF1/TTF2 a temperatura ambiente



**MUCHAS GRACIAS
POR SU ATENCION !**

Nieves SANZ

Asesora Científica - SEBIA LATAM

nsanz@sebia.com