PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE MEDICINA
CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

FRECUENCIA DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS ABO Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD DEL FACTOR DE VON WILLEBRAND (FVW) EN PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON LA ENFERMEDAD PROVENIENTES DE OCHO PROVINCIAS DEL ECUADOR EN EL AÑO 2019

JOSSELYN PROAÑO MENESES

DIRECTORA: MSc. ROSA CHIRIBOGA PONCE

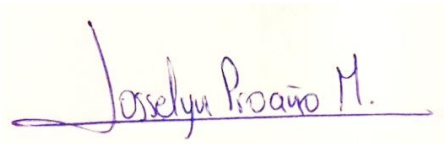
QUITO, 2020

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Josselyn Proaño Meneses, C.I. 1724980121; autora del trabajo de graduación intitulado: Frecuencia de los grupos sanguíneos ABO y su relación con la actividad del factor de Von Willebrand (FvW) en pacientes diagnosticados con la enfermedad provenientes de ocho provincias del Ecuador en el año 2019, previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la Facultad de Medicina-Carrera de Bioquímica:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



Josselyn Proaño Meneses, C.I. 1724980121

DEDICATORIA

A mi querida madre, Consuelo Meneses que por sobre todo ha estado a mi lado siempre, acompañándome en cado paso, en cada meta que me he propuesto. Me ha brindado siempre su apoyo incondicional, me ha confortado para seguir a pesar de los obstáculos. Ella lo es todo, sin ella no sería quien soy. Por esto y muchas otras razones se lo dedico a ella, a mi madre porque si soy sincera llegar hasta aquí fue un trabajo en conjunto, sin ella a mi lado no sé si lo habría hecho. Te amo Mamá.

A mi padre Roberto Proaño que me enseñó a dar lo mejor de mí. Que siempre se ha esforzado por darme las mejores oportunidades. Que me mostró lo que es un trabajador incansable.

A mis tíos Santiago y Carolina que son los más cercanos y afectuosos. A mis queridos primos por alegrarme la vida con sus locuras. A mis abuelos Ana, María, Homero y Marcelo por siempre estar presentes.

A Dios por darme salud y vida para seguir cumpliendo mis objetivos y por permitirme estar aun con mi familia.

Josselyn Proaño Meneses

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por permitirme culminar con éxito esta etapa de mi vida.
Agradezco a mi madre y padre por todo su esfuerzo, apoyo y compañía que me han dado para que pueda cumplir esta meta.
A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, especialmente a la carrera de Bioquímica Clínica. Por ser mi guía académica y un espacio propicio para el desenvolvimiento intelectual y profesional. Además se convirtió en mi segunda casa durante los últimos cuatro años.
Un especial agradecimiento a mi directora, Máster Rosa Chiriboga que fue quien me guió en la realización de este trabajo y pudo brindarme su tiempo, dedicación y conocimientos. También a Máster Marcela Mardones que fue un apoyo fundamental para la culminación del presente trabajo.
Gracias,

Josselyn Proaño Meneses

RESUMEN

"Frecuencia de los grupos sanguíneos ABO y su relación con la actividad del factor de Von Willebrand (FvW) en pacientes diagnosticados con la enfermedad provenientes de ocho provincias del Ecuador en el año 2019".

Introducción: El sistema ABO además de su importante relación con la medicina transfusional ha sido considerado como un factor de riesgo para algunas patologías incluidas las relacionadas con la hemostasia y algunos trastornos neoplásicos. Las investigaciones mencionan que existe una relación estrecha entre el grupo sanguíneo ABO y los niveles del FvW en población sana, sin embargo no existen estudios en pacientes con la enfermedad de Von Willebrand, por lo que el propósito de este estudio fue establecer si los pacientes grupo O presentaban niveles del FvW más bajos que los grupo No-O. **Materiales y Métodos:** Mediante la FUNDHEC-Ecuador se realizó la convocatoria a todos los pacientes que fueron diagnosticados con la enfermedad, se realizó la tipificación del grupo sanguíneo ABO y Rh con reactivos monoclonales de la casa ANTEC, lote 170048 y se determinó los niveles de FvW:Ag mediante inmunoturbidimetría, factor VIII y cofactor ristocetina mediante coagulometría. **Resultados:** Se encontró una prevalencia de 78,1% de pacientes de grupo sanguíneo O. El análisis estadístico determinó una diferencia significativa $p<0.01$ entre los pacientes de grupo O y los pacientes con grupo No-O, confirmándose así que la personas con grupo O son más sensibles a deficiencias cuantitativas del FvW. Los resultados de FVIII y cofactor ristocetina fueron en mayoría bajos, lo que coincide con la descripción general de la enfermedad. También se relacionó los niveles de FvW y FVIII con un coeficiente de correlación de Spearman dando como resultado un $r=0.586$ indicando una fuerte relación positiva. **Conclusiones y Recomendaciones:** Se observó que los pacientes de grupo O son más propensos a tener déficits cuantitativos del FvW en relación con los pacientes No-O. Se recomienda tomar en consideración estos resultados para el seguimiento de los pacientes.

Palabras clave: grupo sanguíneo, factor de von Willebrand, factor VIII, cofactor ristocetina.

ABSTRACT

"Frequency of ABO blood groups and their relation to the activity of Von Willebrand factor (VWF) in patients diagnosed with the disease from eight provinces of Ecuador in 2019."

Introduction: The ABO system, in addition to its important relationship with transfusion medicine, has been considered as a risk factor for some pathologies including those related to hemostasis and some neoplastic disorders. Research mentions that there is a close relationship between the ABO blood group and FvW levels in a healthy population, however there are no studies in patients with von Willebrand disease (VWD), so the purpose of this study was to establish whether the patients with blood type O have lower FvW levels than the Non-O blood type patients have. **Materials and Methods:** FUNDHEC-Ecuador helps to call all patients diagnosed with VWD, it was performed the ABO and Rh blood typing with monoclonal reagents of the ANTEC house, lot 170048 and the levels of FvW: Ag by immunoturbidimetry, factor VIII and cofactor ristocetin by coagulometry. **Results:** It was found a prevalence of 78.1% of people with blood type O. Statistical analysis determined a significant difference $p < 0.01$ between patients of blood type O and patients with blood type Non-O, thus confirming that patients with group O are more sensitive to quantitative deficiencies of the FvW. The results of FVIII and cofactor ristocetina were mostly low, which coincides with the general description of the disease. FvW and FVIII levels were also related to a Spearman correlation coefficient resulting in $r=0.586$ indicating a strong positive relationship. **Conclusions and Recommendations:** It was observed that patients with blood type O are more likely to have quantitative FvW deficits in relation to patients with blood type Non-O. It is recommended to take these results into consideration for patient follow-up.

Key words: blood group, von Willebrand factor, VIII factor, ristocetina cofactor.

TABLA DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN……..……...……I
DEDICATORIA…….……..….II
AGRADECIMIENTO……..……..……..III
RESUMEN……..……..……..IV
ABSTRACT……..……..……..V
i. CAPÍTULO I....9
1.1. JUSTIFICACIÓN....9
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA....11
1.3. OBJETIVOS....13
1.3.1. OBJETIVO GENERAL....13
1.3.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS....13
1.3.3. LIMITACIÓN DEL ESTUDIO....13
ii. CAPÍTULO II....14
2.1. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL....14
2.1.1. ANTECEDENTES....14
2.2. MARCO TEÓRICO....16
2.2.1. ANTÍGENOS DEL SISTEMA ABO....16
2.2.2. ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND....17
2.2.3. FACTOR DE VON WILLEBRAND....19
2.2.4. FUNCIÓN DEL FACTOR DE VON WILLEBRAND....19
2.2.5. PROTEÓLISIS DEL FACTOR DE VON WILLEBRAND....20
2.2.6. ANTÍGENO VON WILLEBRAND (FVW:AG)....21
2.2.7. ACTIVIDAD DEL COFACTOR DE LA RISTOCETINA (COR)....21
2.2.8. RELACIÓN ENTRE LAS PRUEBAS REALIZADAS EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND....22
2.2.9. RELACIÓN ENTRE FACTOR DE VON WILLEBRAND Y ANTÍGENOS DEL SISTEMA ABO....22
2.2.10. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS....23
2.3. MARCO CONCEPTUAL....26
iii. CAPÍTULO III....30
3.1. MARCO METODOLÓGICO....30
3.1.1. MATERIALES Y MÉTODOS....30

3.1.1.1.TIPO DE ESTUDIO 30
3.1.1.3.TAMAÑO DE MUESTRA 30
3.1.1.5.CRITERIOS DE INCLUSIÓN 31
3.1.1.6 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN 32
3.1.1.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO 32
3.2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES 32
3.2.1 VARIABLE DEPENDIENTE: NIVELES DEL FACTOR DE VON WILLEBRAND 32
3.2.2 VARIABLES INDEPENDIENTES: 32
3.3. MATERIALES Y PROCESO 34
3.4. PROCEDIMIENTO 35
3.4.1.FASE UNO: 35
3.4.2.FASE DOS: 36
3.4.3.FASE TRES: 36
3.4.4.FASE CUATRO: 39
3.4.5.FASE CINCO: 39
3.4.6.FASE SEIS: 40
iv. CAPITULO IV 41
4.1 CONTROL DE CALIDAD 41
4.1.1 TIPIFICACIÓN ABO Y RH 41
4.1.2 DETERMINACIÓN DE FACTOR DE VON WILLEBRAND 42
4.1.3 DETERMINACIÓN DE FACTOR FVIII 45
v. CAPITULO V 49
5.1. RESULTADOS 49
5.1.1.DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO 49
5.1.2.DETERMINACIÓN DE FACTOR VON WILLEBRAND 51
5.1.3.DETERMINACIÓN DE FACTOR VIII 52
5.1.4.FRECUENCIA DE GRUPO ABO Y RH 53
5.1.5.ANÁLISIS DE LAS COMORBILIDADES: 53
5.1.6.RELACIÓN GRUPO ABO Y FACTOR DE VON WILLEBRAND 54
5.1.7.RELACIÓN GRUPO ABO Y FACTOR VIII 55
5.1.8.RELACIÓN GRUPO ABO Y LA CONCENTRACIÓN DEL COFACTOR RISTOCETINA 57

5.2. DISCUSIÓN.....59
5.3. CONCLUSIONES.....64
5.4. RECOMENDACIONES.....64
5.5. BIBLIOGRAFÍA.....65
5.6 ANEXOS.....71

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1: Variantes de la enfermedad de von Willebrand 18
Tabla 3.1: Validación de muestras 38
Tabla 4.1: Control de calidad apariencia…..……...41
Tabla 4.2: Control de calidad avidez y especificidad 41
Tabla 4.3: Control de calidad Potencia.....42
Tabla 4.4: Datos primera curva de calibración FvW 43
Tabla 4.5: Controles normal y patológico para primer lote de FvW 44
Tabla 4.6: Datos segunda curva de calibración FvW.....44
Tabla 4.7: Controles normal y patológico para segundo lote de FvW.....45
Tabla 4.8: Datos primera curva de calibración FVIII.....46
Tabla 4.9: Controles para FVIII para la primera curva.....47
Tabla 4.10: Datos segunda curva de calibración FVIII 47
Tabla 4.11: Controles para FVIII para la segunda curva 48
Tabla 5.1: Distribución de género……..49
Tabla 5.2: Distribución por grupo etario…… 50
Tabla 5.3: Distribución por procedencia……. ……..50
Tabla 5.4: Estadística descriptiva de los datos de FvW…….51
Tabla 5.5: Resultados de FvW por categorías……51
Tabla 5.6: Estadística descriptiva de los datos de FVIII…….52
Tabla 5.7: Resultados de FVIII……...52
Tabla 5.8: Frecuencia de grupos ABO y Rh……53
Tabla 5.9: Frecuencia de subgrupos de A……53
Tabla 5.10: Grupo ABO vs. FvW……54
Tabla 5.11: Prueba de chi-cuadrado para grupos O y No-O…….55
Tabla 5.12: Grupo ABO vs. FVIII……56

Tabla 5.13: Pruebas de normalidad……...57
Tabla 5.14: Correlación de Spearman…….. 57
Tabla 5.15: Grupo ABO vs. Cofactor ristocetina……..58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 4.1: Primera curva calibración de FvW 43
Gráfico 4.2: Segunda curva de calibración de FvW 44
Gráfico 4.3: Primera curva de calibración de FVIII 46
Gráfico 4.4: Segunda curva de calibración para FVIII 48
Gráfico 5.1: Grupos ABO vs Niveles del FvW……..54
Gráfico 5.2: Grupo ABO vs. FVIII……...56
Gráfico 5.3: Grupo ABO vs. Cofactor ristocetina……58

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Estructura de los antígenos del sistema ABO 16
Figura 2.2: Sitios de unión del Factor de von Willebrand 20

ANEXOS

Anexo A: Formulario de consentimiento informado 71
Anexo B: Consentimiento informado para padres o representantes de participantes menores de edad 74
Anexo C: Asentimiento informado para participantes menores de edad 76
Anexo D: Carta de aprobación del CEISH-PUCE.....77
Anexo E: Aprobación del Ministerio de Salud Pública 77
Anexo F: Instrumentos, Metodologías y pruebas estándar.....80
Anexo G: Prueba de tipificación sanguínea.....81
Anexo H: Inserto de la cuantificación del factor de von Willebrand 82
Anexo I: Inserto de la actividad del cofactor Ristocetina.....84
Anexo J: Inserto para determinación de factor VIII.....86
Anexo K: Especificaciones del coagulómetro.....88
Anexo L: Informe general post-estudio.....90
Anexo M: Certificado de cursos de capacitación en enfermedad de von Willebrand 91
Anexo N: Proceso del estudio (fotos) 92

LISTA DE SIGLAS

Ac: Anticuerpo

Ag: Antígeno.

CEISH-PUCE: Comité de ética en investigación con Seres Humanos de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

CoR: Cofactor ristocetina.

MSP: Ministerio de Salud Pública

FUNDHEC: Fundación Hemofílica Ecuador

FVIII: Factor VIII de la coagulación.

FvW: Factor de von Willebrand.

FvW/Ag: Antígeno del factor de von Willebrand.

FvW:pp: Propéptido del factor de von Willebrand.

FvW/UC: Prueba de unión al colágeno

GpIb/IX: Glicoproteína Ib/IX.

GpIIb/IIIa: Glicoproteína IIb/IIIa.

Pre-pro-VWF: Precursor de factor de von Willebrand.

TEV: tromboembolismo venoso.

TTP: Tiempo de tromboplastina parcial.

TP: Tiempo de protrombina.

VWD: Enfermedad de von Willebrand.

INTRODUCCIÓN

Los antígenos del sistema sanguíneo ABO han sido asociados a varias enfermedades e infecciones; así el cáncer gástrico es 20% más frecuente en personas tipificadas como A, mientras que las úlceras gástricas y duodenales son comunes en personas con grupo sanguíneo O. Así también los niveles de concentración de factor VIII (FVIII), V y IX se encuentran en mayor proporción en personas de grupo A presentando mayor riesgo en la aparición de trombosis, mientras que es menor en los individuos tipificados con grupo sanguíneo O (Liumbruno & Franchini, 2013).

La evidencia existente en las investigaciones realizadas durante varios años apoya la teoría del vínculo entre el grupo sanguíneo ABO y la hemostasia especialmente con los factores de la coagulación que intervienen para llevarla a cabo. Se ha mencionado varias veces que el grupo ABO influye en los niveles del factor de von Willebrand (FvW) (Márquez, Lancheros, & Díaz, 2019). Esta relación puede deberse especialmente a los patrones de glicosilación relacionada con ABO y FvW que influencian en la depuración y los niveles funcionales del factor (Franchini, Coppola, Mengoli, Rivolta, & Riccardi, 2017).

Una de la teorías estudiadas para explicar la relación de los grupos ABO y FvW es la presencia de enzimas glicosiltranferasas A y B activas, encontradas en el aparato de Golgi de células endoteliales, las que modifican carbohidratos terminales para generar antígenos A y B en los oligosacáridos “H” existentes en el FvW, mientras que las enzimas ABO-O ‘inactivas’ no pueden hacer estas modificaciones en los antígenos H del FvW (Liu, Chen, Yang, & Guo, 2017).

Aparentemente los antígenos A y B le dan una protección extra frente a la proteólisis de la ADAMST-13, consecuentemente en los individuos con grupo O la enzima ADAMST-13 degrada más rápido el FvW, disminuyendo sus niveles plasmáticos (Márquez, Lancheros, & Díaz, 2019).
El complejo FvW-VIII en individuos de grupo sanguíneo O es más rápidamente eliminado que en aquellos de grupo no-O, contribuyendo de esa manera en la

reducción de la vida media del factor VIII (Franchini, Coppola, Mengoli, Rivolta, & Riccardi, 2017).

El factor de von Willebrand (FvW) es una glucoproteína esencial para la hemostasia pero los mecanismos que controlan su nivel en plasma aún no ha sido bien determinado adjudicándose un 66% a factores genéticos y a diferencias con los grupos sanguíneos ABO, investigaciones han reconocido que existe una asociación entre el grupo ABO y el factor von Willebrand (FvW). Al usar rangos de FvW basado en los grupos ABO esto influenciaría el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand (Akin, Balkan, Yilmaz, & Kavakli, 2012).

Estas teorías fomentan a realizar estudios en la población ecuatoriana con enfermedad de von Willebrand donde el FvW ya se encuentra afectado y determinar si existe esta relación entre grupo sanguíneo y una mayor disminución del FvW, proporcionando resultados que informen a los pacientes sobre su condición y apoyen al registro del sistema de salud.

La sintomatología de la enfermedad se caracteriza por hemorragias mucocutáneas de intensidad variable (Hernández, Zavala, Quintana, & Reyes, 2015). A pesar de ser considerada la coagulopatía más frecuente, muchos de los pacientes no son diagnosticados porque el diagnóstico de la enfermedad es complejo, no existen un solo parámetro que por sí solo determine su presencia, por ahora el diagnóstico se basa en la historia clínica del paciente y en un panel de pruebas de laboratorio que pueden llegar a ser muy costosas o ni siquiera estar disponibles en todos los países (Zavelia & Jaloma, 2015). Además, en algunas variantes de la enfermedad el FvW no se une correctamente al FVIII lo que causa una baja considerable del FVIII haciendo que estos pacientes sean clasificados como hemofílicos (kaushansky & Levi, 2018).

CAPÍTULO I

1.1. JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand tiene varios desafíos. Debido a que el factor de von Willebrand es una glicoproteína con diversas propiedades funcionales**,** esto contribuye a la gran diversidad de síntomas clínicos y diferencias en el riesgo de sangrado en los pacientes (Favaloro & Lippi, 2017). Para llegar al diagnóstico el médico debe tomar en cuenta toda la historia clínica del paciente así como los antecedentes familiares, para ordenar una serie de pruebas iniciales y luego considerar si se requieren pruebas más específicas para realizar un diagnóstico diferencial y llegar a la subclasificación de la enfermedad (Favaloro & Lippi, 2017).

En Ecuador no existe un registro completo acerca de la enfermedad de von Willebrand. No aparece en la base de datos de morbilidad en Ecuador (Ganoa, 2014). Las pruebas necesarias para completar el diagnostico no están disponibles en el país, incluso no existe una guía clínica publicada en las páginas del Ministerio de Salud Pública para el diagnóstico de la enfermedad (MSP, 2019). Adicionalmente después de revisar datos del INEC se encontró que no hay suficientes profesionales hematólogos en el país y están distribuidos solamente en costa y sierra (INEC, 2016). Esto pone en evidencia la necesidad de realizar más investigaciones en esta población para generar más información e ir creando conciencia sobre la importancia del registro de todas las enfermedades.

Tomando en consideración que el factor de la coagulación afectado en esta patología es influenciado por el grupo sanguíneo, según lo demuestran varios estudios realizados en poblaciones sanas, se consideró relevante investigar si esta relación también existe dentro de la población de pacientes con enfermedad de von Willebrand. Las bases para este estudio son que el sistema eritrocitario ABO está formado por antígenos que determinan el grupo sanguíneo de una persona, son moléculas que se expresan no solo en la superficie de los glóbulos rojos sino también en otras células y tejidos incluyendo neuronas sensoriales,

plaquetas y endotelio vascular, por lo que la influencia de los antígenos se le ha relacionado con otras condiciones clínicas (Liumbruno & Franchini, 2013).

Los antígenos ABH del sistema eritrocitario ABO tienen una estrecha relación con la hemostasia, es decir con el conjunto de mecanismos que permiten detener una hemorragia, convirtiéndose así en un trascendental determinante de los niveles plasmáticos del factor de von Willebrand (FvW) y factor VIII, no solo en individuos sanos sino también en individuos con patologías como la enfermedad de von Willebrand (Franchini, Crestani, Frattini, Sissa, & Bonfanti, 2014).

El factor de von Willebrand participa en la adhesión y agregación plaquetaria además otra de sus funciones es unirse al factor VIII (FVIII) en circulación, transportarlo y prevenir su eliminación plasmática, lo que pone en evidencia una fuerte relación entre ambos factores. La vida media del FvW es de 12 horas en circulación sanguínea, su eliminación o proteólisis es una de las acciones más importantes de la enzima ADAMTS 13 para mantener el balance plasmático de factor, evitando que se formen trombos (Woods, y otros, 2016). La estructura de los hidratos de carbono de los antígenos ABH está relacionada directamente con la susceptibilidad del FvW a la enzima ADAMTS 13, se ha observado mayor explosición a la acción de la ADAMTS-13 en el grupo sanguíneo O (Márquez, Lancheros, & Díaz, 2019), este descubrimiento pone de manifiesto la importante función que ejercen los antígenos del sistema ABO y su importancia en los pacientes con trastornos de la coagulación como la enfermedad de von Willebrand.

Para analizar la actividad del FvW se determinaron los niveles del antígeno del factor von Willebrand (FvW:Ag) en plasma, así como la actividad del FVIII ya que la actividad de ambos está estrechamente relacionada, y finalmente se medió el cofactor ristocetina que evalúa en general la funcionalidad del FvW y su capacidad de agregar plaquetas para la formación del coágulo primario necesario para controlar hemorragias.

Con los resultados se beneficiará a la comunidad de pacientes con enfermedad de von Willebrand quienes conocerán su grupo sanguíneo. Se determinará la

relación existente entre el déficit de antígeno del factor de von Willebrand y el grupo sanguíneo en las personas con diagnóstico de enfermedad de von Willebrand. Se podrá corroborar si las personas diagnosticadas con la enfermedad de von Willebrand son en mayoría portadores del grupo sanguíneo O y poseen una menor actividad de este factor como lo documentan las investigaciones realizadas en las que se ha determinado una baja concentración del FvW en pacientes diagnosticados con esta patología (Franchini, Crestani, Frattini, Sissa, & Bonfanti, 2014), adicionalmente la información podrá ayudar al paciente a considerar cambios en sus hábitos, tomando en cuenta si hay relación del FvW con el grupo sanguíneo. Tal vez podría considerarse si es necesario cambiar el tratamiento de los pacientes o su dosificación ya que se ha documentado que el aclaramiento de FvW es fuertemente influenciado por el grupo sanguíneo incluso en pacientes con enfermedad de von Willebrand (Franchini, Crestani, Frattini, Sissa, & Bonfanti, 2014).

Además toda información será entregada a la dirección de investigación del MSP quienes podrían usarla para plantear nuevos proyectos investigativos.

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El locus del gen que da origen a los grupos sanguíneos ABO es un determinante genético de los niveles plasmáticos del complejo factor de von Willebrand (FvW)-factor VIII (FVIII) (Liu, Chen, Yang, & Guo, 2017), considerando que el factor von Willebrand (FvW) cumple la función de ser la proteína transportadora del FVIII previniendo su eliminación plasmática, por lo tanto los niveles plasmáticos del FVIII están mediados por el FvW y este a su vez está relacionado con el grupo sanguíneo, fibrinógeno, triglicéridos y factores genéticos o adquiridos que van a intervenir directamente en la biosíntesis y aclaramiento o depuración hepática de este complejo disminuyendo o aumentando sus niveles plasmáticos (Liu, Chen, Yang, & Guo, 2017).

En varios estudios se ha estudiado la estrecha relación entre el grupo sanguíneo y el FvW, tanto en poblaciones sanas como en poblaciones con patologías como

la enfermedad de von Willebrand. Tal es el caso de un estudio realizado en Canadá que mostró que en pacientes con enfermedad de von Willebrand tipo 1 el 66% fue tipificado como tipo de sangre O, mientras que en la población sana apenas el 46% es grupo O. En otro estudio realizado en Europa se obtuvieron cifras similares: 78% de grupo O en pacientes con von Willebrand versus 38% en población normal. Los datos muestran mayor frecuencia del grupo sanguíneo O en pacientes con von Willebrand y también podría sugerir que el grupo O favorece la expresión fenotípica de la enfermedad (Franchini, Crestani, Frattini, Sissa, & Bonfanti, 2014).

Como se mencionó anteriormente actualmente en el Ecuador existe poca información acerca de las personas con la enfermedad de von Willebrand. Es un problema que siendo catalogada como enfermedad rara dentro de lo que refiere el registro oficial en el 2012, todavía solo se tenga información de menos de 50 pacientes a nivel país, por lo que tener información relevante que añada el conocimiento sobre esta enfermedad es de gran importancia.

Es una enfermedad de la que no se ha hecho suficiente seguimiento por lo que la realización de este estudio permitirá establecer la relación existente entre el tipo de sangre con los niveles plasmáticos del FvW en pacientes con enfermedad de von Willebrand. Esta información ayudará a identificar si los pacientes tipificados como grupo O presentan déficits más marcados de antígeno de von Willebrand así como actividad más reducida del factor FvW permitiendo de esta forma que se proporcione de ser necesario un tratamiento preventivo y seguimiento a todos los pacientes tipificados como O y diagnosticados con la patología. Adicionalmente toda la información obtenida será entregada al Ministerio de Salud Pública para que tengan registro y consideren investigaciones futuras en esta población.

Pregunta de investigación: ¿Cuál es la relación existente entre la actividad del factor von Willebrand con el grupo sanguíneo ABO de los pacientes diagnosticados con la enfermedad de Von Willebrand?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación entre la actividad del factor de von Willebrand con el grupo sanguíneo ABO en pacientes diagnosticados con la enfermedad provenientes de ocho provincias ecuatorianas en el año 2019.

1.3.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar la concentración del factor VIII (FVIII), antígeno von Willebrand (FvW:Ag) y cofactor ristocetina (CoR) mediante inmunoturbidimetría y coagulometría, en los pacientes diagnosticados con la enfermedad de von Willebrand provenientes de ocho provincias ecuatorianas.
- ✓ Identificar el tipo sanguíneo ABO y factor Rh en los pacientes diagnosticados con la enfermedad de Von Willebrand provenientes de ocho provincias ecuatorianas mediante la técnica de aglutinación en tubo.
- ✓ Establecer la existencia de comorbilidades en los pacientes diagnosticados con la enfermedad de von Willebrand mediante la revisión de datos proporcionados por el paciente.
- ✓ Relacionar los niveles del factor de von Willebrand, cofactor ristocetina y el factor VIII, con el grupo sanguíneo ABO en los pacientes diagnosticados con la enfermedad de Von Willebrand provenientes de ocho provincias ecuatorianas.

1.3.3. LIMITACIÓN DEL ESTUDIO

El propósito del presente estudio es determinar una asociación entre el grupo sanguíneo y los niveles del factor de von Willebrand, sin embargo no establecerá valores de referencia para la población de estudio.

Durante el desarrollo del presente trabajo encontramos que muchos de los pacientes no habían recibido un diagnóstico definitivo, por lo que al final del estudio solo se utilizaron los datos de pacientes diagnosticados con enfermedad de von Willebrand.

CAPÍTULO II

2.1. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1.1. Antecedentes

Existen varios estudios en los que se ha reportado la relación entre el grupo ABO y los niveles plasmáticos del factor de von Willebrand, así en el trabajo de Alharbi y otros (2018) luego de realizar análisis de laboratorio utilizados para evaluar la actividad del factor de von Willebrand y los efectos relativos que podía tener el grupo sanguíneo sobre esta actividad, identificaron que las personas con tipo sanguíneo O exhibieron valores medios más bajos para todas las pruebas, que incluyeron antígeno del FvW, FVIII, cofactor a la ristocetina (FvW:CoR), y unión de FvW al colágeno. Mientras que las personas tipificadas como A y/o B mostraron valores medios más altos, mostrando la relación entre el tipo sanguíneo O y niveles menores del FvW (Alharbi, Hassan, Al-Momen, & Al-Saleh, 2018). Si bien este estudio se realizó en población sana igualmente muestra la relación del grupo sanguíneo y el FvW.

En un estudio más reciente realizado en el 2015 por Liu y otros, demostró la relación de los grupos O y no-O (A y B) con los niveles plasmáticos de FvW, ADAMTS-13, factor VIII (FVIII) en pacientes con cáncer de pulmón y un grupo control. Encontraron que los niveles de FvW y FVIII en personas con grupo sanguíneo no-O eran mayores, mientras que el nivel de ADAMTS-13 era menor. Considerando que la ADAMTS-13 es una enzima tipo metaloproteasa que se encarga de romper lo multímeros grandes del FVW es lógico que si está disminuida, el FvW se encuentre más alto ya que sufriría menor proteólisis (Liu, Chen, Yang, & Guo, 2017).

También se han realizado estudios relacionando el grupo sanguíneo y FvW en pacientes con enfermedad de von Willebrand que es la población que se utilizará en el presente estudio. Tanto en un estudio canadiense como en un estudio europeo realizado en pacientes con diagnosticados con enfermedad de von Willebrand se encontró mayor frecuencia del tipo sanguíneo O, superando con

una diferencia porcentual significativa a la frecuencia encontrada en población sana de estos países donde se realizaron los estudios (Franchini, Crestani, Frattini, Sissa, & Bonfanti, 2014).

Como se puede observar son varios los estudios que coinciden en encontrar relación entre el grupo ABO y los niveles de FvW así como su actividad. En todos ellos se ha encontrado menores niveles del FvW en personas con grupo O y niveles mayores en personas A y B. Las pruebas realizadas en los estudios fueron varias sin embargo las que tuvieron una mayor correlación entre ellas y con los grupos sanguíneos fueron FvW:Ag, FVIII y CoR.

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. Antígenos del Sistema ABO

El sistema sanguíneo ABO fue el primero en ser descubierto por Landsteiner en 1900 y sigue siendo el más importante en la medicina transfusional. Los antígenos que determinan que una persona sea identificada como A y B se diferencian del grupo O por la adición de distintos azúcares a una cadena de carbohidratos precursora que porta al antígeno H en la superficie de los eritrocitos (Cortés & Muñiz, 2014). (Figura 2.1)

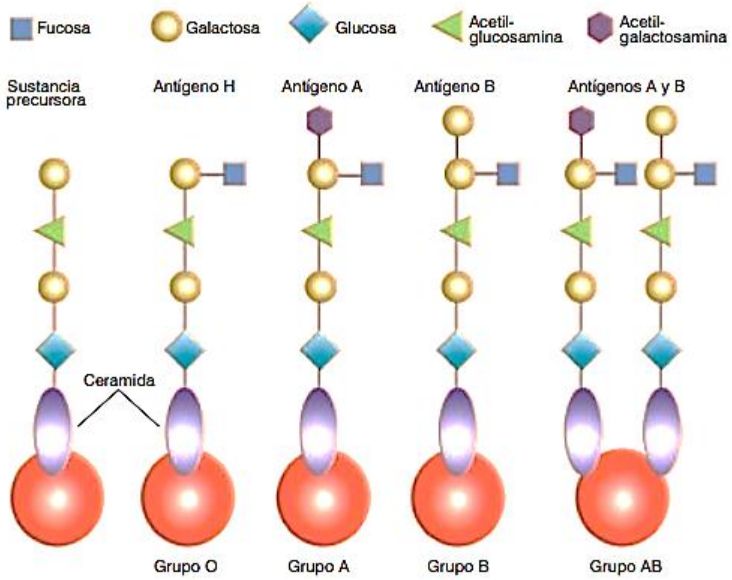


Figura 2.1: Estructura de los antígenos del sistema ABO

Autor: Cortes & Muñiz, 2014

Fuente: Inmunohematología básica y aplicada 2nd.ed

Los antígenos A y B son producidos por genes del cromosoma 9. Lo que les da la especificidad antigénica son sus azúcares terminales, la acetil-galactosamina para el antígeno A y la galactosa para el antígeno B (Cortés & Muñiz, 2014). Estas azúcares terminales son añadidas por enzimas específicas: 1,3 acetilgalactosaminiltransferasa y 1,3 galactosiltranferasa. En los individuos con grupo O estas enzimas no están activas, solo está activa la enzima 1,2

fucosiltransferasa que se encarga de añadir la fucosa del antígeno H (CEPECAP, 2015).

Los antígenos del sistema no sólo están en los eritrocitos, si no que tienen amplia distribución en los tejidos, se los puede encontrar en plasma, plaquetas, linfocitos y fluidos corporales como saliva, orina, lágrimas, líquido amniótico, leche, líquidos digestivos (CEPECAP, 2015).

2.2.2. Enfermedad de von Willebrand

La enfermedad de von Willebrand es el trastorno de la coagulación más frecuente en los humanos y su distribución es mundial. Afecta a la hemostasia primaria que incluye la interacción de las plaquetas, FvW y endotelio. La enfermedad se caracteriza por hemorragias mucocutáneas de intensidad variable (Hernández, Zavala, Quintana, & Reyes, 2015).

La enfermedad generalmente se debe a defectos congénitos, aunque hay formas adquiridas. Los defectos congénitos causan defectos cuantitativos y/o cualitativos en el FvW, de acuerdo a esto se han clasificado en 3 variantes base: 1, 2 y 3; el tipo 2 tiene su propia subdivisión (2A, 2B, 2M, 2N). Dentro de las anormalidades que afectan al FvW en la enfermedad de von Willebrand se encuentran: interacción anormal con las plaquetas, defectos en la interacción con el colágeno, con el factor VIII o en la dimerización/multimerización; alteración en el transporte y secreción, aumento de la proteólisis (Woods, Blanco, Kempfer, Paiva, & Bermejo, 2016).

De las variantes de la enfermedad, la de tipo 1 es la más frecuente, se hereda de manera autosómica dominante y se caracteriza por una deficiencia cuantitativa parcial del factor de von Willebrand. Dependiendo de los niveles plasmáticos del factor se describe la enfermedad de von Willebrand tipo 1 como severa, definida o probable (Woods, Blanco, Kempfer, Paiva, & Bermejo, 2016). Es decir, los niveles del FvW se relacionan con la manifestación clínica.

Tabla 2.1: Variantes de la enfermedad de von Willebrand

Clasificación de la Enfermedad de Von Willebrand (VWD)	
Tipo de VWD	**Caracterizado por**
VWD1	Deficiencia cuantitativa del factor de von Willebrand
VWD2	Anormalidad cualitativa del factor de von Willebrand
VWD2A	Disminución de la afinidad por la glicoproteína plaquetaria Ibα. Disminución o ausencia de los multímeros grandes e intermedios.
VWD2B	Aumento de la afinidad del FvW por la glicoproteína Ibα. Disminución o ausencia de multímeros grandes
VWD2M	Disminución de la afinidad por la glicoproteína plaquetaria Ibα. Sin pérdida de multímeros grandes.
VWD2N	Defecto de la afinidad por la afinidad del FvW por el factor VIII (*)
VWD3	Ausencia del factor de von Willebrand

VWD: enfermedad de von Willebrand; tipo 1: VWD1; tipo 2: VWD2; subtipo 2A: VWD2A; subtipo 2B: VWD2B; subtipo2M: VWD2M; subtipo2N: VWD2N, tipo 3: VWD3; FvW: factor de von Willebrand.

(*) Fenotipo similar a hemofilia A.

Autor: Woods A., Blanco, A., Kempfer, A., Paiva, J., Bermejo, E., Luceros, A., & Lazzari, M.
Fuente: Factor de von Willebrand y enfermedad de von Willebrand: nuevos enfoques diagnósticos.

El diagnóstico de la enfermedad no es fácil, ya que no existen un solo parámetro que por sí solo determine su presencia, por ahora el diagnóstico se basa en la historia clínica del paciente y en un panel de pruebas de laboratorio (Woods, Blanco, Kempfer, Paiva, & Bermejo, 2016). Además hay que tomar en cuenta que existen varios factores que afectan los niveles del factor de von Willebrand como: la edad, factores hormonales, embarazo, ejercicio, traumas, hiper e hipotiroidismo, falla renal, enfermedad hepática, diabetes, cáncer, procesos inflamatorios, estrés y el grupo sanguíneo ABO (Hernández, Zavala, Quintana, & Reyes, 2015).

2.2.3. Factor de von Willebrand

Es una glicoproteína con alto peso molecular, que participa en la hemostasia, es sintetizada en las células endoteliales y descendientes megacarioblásticos. Es codificado por el gen VWF localizado en el brazo corto del cromosoma 12. Su estructura inicial es un monómero que después de varias y sucesivas dimerizaciones y multimerizaciones forma multímeros de diferentes pesos moleculares: pequeños, intermedios, grandes y extra grandes, los multímeros grandes son los que tienen mayor actividad funcional, los extra grandes son más activos pero circulan poco en plasma (Woods, Blanco, Kempfer, Paiva, & Bermejo, 2016).

La síntesis del FvW se inicia en el retículo endoplásmico como el precursor 'pre-pro-VWF', este se separa del péptido señal, manteniéndose como 'pro-VWF' que se ensambla para formar dímeros mediante uniones disulfuro en posiciones carboxiterminales, después pasa un proceso de glicosilación y es transportado al aparato de Golgi donde la proteína madura, se crean más puentes disulfuro ahora en posiciones animoterminales y se van formando multímeros a partir de los dímeros, una vez formados los multímeros de FvW una parte se libera directamente en el plasma y otra es almacenada en los cuerpos de Weibel Palade (Woods, Blanco, Kempfer, Paiva, & Bermejo, 2016) (Hernández, Zavala, Quintana, & Reyes, 2015).

2.2.4. Función del factor de von Willebrand

Por su estructura se conoce que su papel principal es unirse a diferentes ligandos del torrente sanguíneo y de la pared del vaso dañado. Cumple 3 funciones fisiológicas en la hemostasia:

- Primero media la adhesión plaquetaria en el sitio de daño vascular uniéndose al receptor plaquetario GpIb/IX y al colágeno expuesto del subendotelio vascular.

- Segundo ayuda en la agregación plaquetaria por su unión receptor plaquetario GpIIb/IIIa.
- Finalmente protege al factor VIII uniéndose a él, evita que sea degrado por la acción proteolítica de la proteína C activa en el torrente sanguíneo. (Hernández, Zavala, Quintana, & Reyes, 2015).

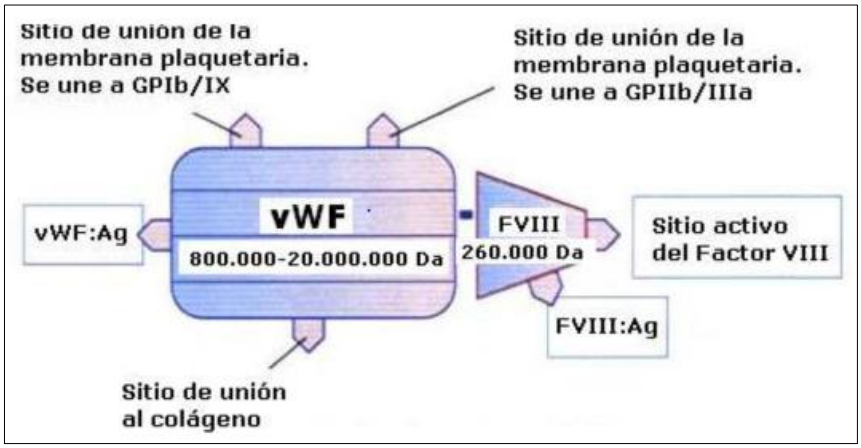


Figura 2.2: Sitios de unión del Factor de von Willebrand

Autor: Rodak, Fritsma, & Keohane, 2014

Fuente: Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas. 4ta ed.

2.2.5. Proteólisis del factor de von Willebrand

La proteólisis es esencial para mantener el balance, evitando que se formen trombos. La enzima ADAMTS13 se encarga de escindir los multímeros extra grandes de FvW que son muy activos y los convierte en multímeros pequeños que son menos trombogénicos es decir con menor capacidad de formar trombos o coágulos.

La plasmina también puede degradar complejos plaqueta-FvW en la superficie de las células endoteliales en ausencia de ADAMTS13, este mecanismo es dependiente de shear stress o tensión cortante ejercida en el endotelio (Woods, Blanco, Kempfer, Paiva, & Bermejo, 2016).

2.2.6. Antígeno von Willebrand (FvW:Ag)

El antígeno de von Willebrand (FvW:Ag) actualmente se refiere a una determinación que se realiza en el laboratorio. Esta prueba cuantifica el nivel plasmático total del factor de von Willebrand (Álvarez, 2012).

Cuando se empezó a desarrollar esta prueba existía confusión entre el factor VIII y el FvW, luego con técnicas de separación lograron determinar que eran moléculas distintas. Se empezó a usar la inmunoprecipitación para medirlo, para esto usaban anticuerpos de conejo policlonales anti-FvW humano y nombraron a la prueba como Antígeno de von Willebrand porque estos anticuerpos identifican al FvW como antígeno (Favaloro, 2014).

Es una de las pruebas utilizadas para apoyar el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand, sobre todo para los tipos de la enfermedad en los que se presenta una deficiencia cuantitativa del FvW como son el tipo I y III (Woods, Blanco, Kempfer, Paiva, & Bermejo, 2016).

2.2.7. Actividad del cofactor de la Ristocetina (CoR)

La ristocetina se utilizaba como antibiótico, hasta que observaron que provocaba trombocitopenia, posteriormente Howard y Firkin en 1971 reportaron que la ristocetina también causaba agregación plaquetaria de plasma rico en plaquetas de pacientes sanos mientras que en pacientes con la enfermedad de von Willebrand no se evidenciaba agregación, a menos que se adicionara plasma normal indicando que el problema se encontraba en la deficiencia de un componente funcional del plasma. Finalmente optaron por usar plaquetas lavadas y desarrollaron el ensayo cuantitativo conocido como cofactor ristocetina, que se realiza por turbidimetría (Favaloro, 2014).

El cofactor ristocetina en la actualidad sigue siendo una prueba necesaria para el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand, ya que se encarga de medir indirectamente la afinidad del FvW por la glicoproteína Ib (GpIb) (Álvarez, 2012).

2.2.8. Relación entre las pruebas realizadas en el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand

Dentro de las pruebas más usadas para el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand se tiene la determinación de: FvW:Ag, FvW: CoR, factor VIII(FVIII), unión al colágeno (FvW:CB) y unión al factor VIII (FvW:FVIII). Como se habló en puntos anteriores, el FvW se une a diferentes moléculas para cumplir su función. Entre las moléculas a las que se une se encuentra la glicoproteína plaquetaria Ib y el FVIII. La unión del FvW con la GpIb es importante para la evaluación de la adhesión plaquetaria, esto se realiza con la prueba de CoR.

También se conoce que la unión del FvW al FVIII les da estabilidad, protege al FVIII de la proteólisis, además de que el factor VIII se encarga de aumentar la velocidad de reacción en la cascada de coagulación lo que lo hace muy importante para que la función del FvW se complete, es por eso que se evalúa tanto los niveles del FVIII como su unión al FvW. Cualquier molécula que se une al FvW es relevante para evaluar su función (Woods, Blanco, Kempfer, Paiva, & Bermejo, 2016). En un estudio realizado por Miller y otros (2003) donde se realizó FvW: Ag, FVIII, FvW: CoR y FvW: CB para evaluar la actividad del FvW, mediante un análisis estadístico con pruebas de correlación encontraron que todas estas pruebas estaban significativamente correlacionadas con FvW: Ag y también entre ellas.

2.2.9. Relación entre Factor de von Willebrand y antígenos del sistema ABO

En varios estudios ya se ha establecido la relación del sistema ABO con el factor de von Willebrand (FvW) (Franchini, Crestani, Frattini, Sissa, & Bonfanti, 2014) (Alharbi, Hassan, Al-Momen, & Al-Saleh, 2018) (Akin, Balkan, Yilmaz, & Kavakli, 2012). Esta relación puede deberse al hecho de que los antígenos del sistema ABO aparecen en oligosacáridos ligados al FvW lo que establece la base molecular para la regulación de los niveles de FvW dependiente al grupo ABO.

Se menciona que la presencia de enzimas glicosiltranferasas A y B activas, encontradas en el aparato de Golgi de células endoteliales, modifican carbohidratos terminales para generar antígenos A y B en los oligosacáridos H existentes en el FvW, mientras que las enzimas ABO-O 'inactivas' no pueden hacer estas modificaciones en los antígenos H del FvW (Liu, Chen, Yang, & Guo, 2017). La adición de los antígenos A y B en el FvW puede influir en los niveles circulantes del FvW así como en su función mediante varios mecanismos como la alteración de la síntesis y/o secreción del factor, la regulación de la proteólisis de FvW por la ADAMTS13, la modulación de su eliminación, la modificación en su actividad biológica o una combinación de varios de estos mecanismos (Liu, Chen, Yang, & Guo, 2017).

2.2.10. Métodos diagnósticos

Tipificación sanguínea por aglutinación en tubo

La determinación del grupo sanguíneo ABO por aglutinación se basa en un principio antígeno-anticuerpo. Para la prueba se utilizan glóbulos rojos lavados del paciente, estos contienen es su superficie a los antígenos (Ag) que pueden ser A, B o H. Los reactivos para la prueba contienen los anticuerpos, generalmente obtenidos de suero de bovino o conejo. Estos anticuerpos (Ac) son específicos para un tipo de antígeno por ejemplo: el Ac. Anti- A se unirá solo a los glóbulos rojos que tengan Ag. A. El Ac anti-B se unirá a los glóbulos rojos que tengan Ag. B, y el Ac. Anti-D se unirá a los glóbulos rojos que tengan Ag. H. (AABB, 2012).

Fundamento de la determinación de Antígeno de von Willebrand

La determinación se basa en reacciones antígeno anticuerpo. Antes se usaba el método de electroinmunodifusión de Laurell donde se hace una electroforesis con las proteínas a diferenciar en este caso con la muestra del paciente para encontrar el FvW. Después de la electroforesis las proteínas de la muestra están separadas, entonces se coloca la lámina de agar sobre otra que tiene los

antígenos o anticuerpos, y se corre una electroforesis cruzada. Esto produce una precipitación en forma de cohetes (Condori, 2011).

Actualmente se puede utilizar métodos como el de enzimo-inmunoensayo (ELISA) que tiene buena sensibilidad aproximadamente 0.13ng/mL dependiendo del fabricante (Thermo Scientific, 2016). El método se basa en tres características: la especificidad de los anticuerpos usados, la especificidad y el poder catalítico de las enzimas. Se combina una reacción inmunológica donde se utilizan anticuerpos anti-FvW que reconocen una parte del factor de von Willebrand como antígeno y se unen, entonces se adiciona enzimas como sustancias marcadoras (Betancourt, 2012).

Fundamento de Cofactor ristocetina

Esta prueba se basa en la capacidad de la ristocetina para aglutinar plaquetas frescas o fijadas en presencia del FvW. Se puede realizar por turbidimetría. Al método le falta un poco de sensibilidad y reproducibilidad pero se puede usar un ELISA con GbIb derivada de plasma que ayuda a mejorar la sensibilidad y a reducir el coeficiente de variación (Meschengieser, 2015). Las alteraciones en los multímeros de alto peso molecular o en el dominio A1 del FvW alteran los resultados en la actividad del CoR (Woods, Blanco, Kempfer, Paiva, & Bermejo, 2016).

Turbidimetría

Para el presente estudio se utilizará la turbidimetría para las diferentes pruebas. La turbidimetría consiste en una técnica espectrofotométrica donde un haz de luz proveniente de una fuente de poder incide directamente sobre una muestra y posteriormente se mide la intensidad de luz emitida, que dependerá de la turbidez de la muestra (DiaSys, 2015).

Inmunoturbidimetría con partículas de refuerzo

Esta técnica que facilita la determinación cuantitativa de proteínas en plasma. Existe una interacción antígeno-anticuerpo que forma aglutinación y genera turbidez en la muestra sobre la que incidirá la luz del espectrofotómetro. Una vez medida la luz trasmitida esta se correlaciona con el analito medido en este caso antígeno de von Willebrand.

Esta técnica con partículas de refuerzo se caracteriza porque los anticuerpos estarán recubriendo partículas microscópicas. Esta modificación aumenta la sensibilidad del método ya que las partículas pueden extender los complejos antígeno-anticuerpos formados en su superficie lo que aumenta la señal medida por el sistema óptico (DiaSys, 2015).

2.3. MARCO CONCEPTUAL

ADAMST-13: es una enzima tipo metaloproteasa. Se encarga de romper los multímeros grandes del factor de von Willebrand para formar multímeros más pequeños, con menor actividad trombótica y controlar la formación de coágulos innecesarios (Liu, Chen, Yang, & Guo, 2017).

Adhesión plaquetaria: es el proceso en el cual las plaquetas se unen al colágeno del subendotelio vascular. Se da por medio de la glicoproteína Ib/IX de la membrana plaquetaria y la acción del FvW. Es el primer paso para formar el tapón plaquetario después de una lesión en la pared vascular (Universidad de Cantabria, 2017).

Aglutinación: es una interacción entre antígeno y su anticuerpo especifico. El anticuerpo reconoce al antígeno y se une a él, lo que provoca formación de cúmulos visibles (Mihalez, 2015).

Agregación plaquetaria: es el proceso en el cual las plaquetas se unen entre ellas por medio de la glicoproteína IIb/IIIa de su membrana y utilizando al fibrinógeno como puente de enlace, en este proceso las plaquetas se transforman estructuralmente, liberan el contenido de sus gránulos lo que atrae más plaquetas y las activa para continuar el proceso de coagulación (Universidad de Cantabria, 2017).

Anticuerpos: son moléculas glucoprotéicas con alto grado de especificidad y afinidad, que son producidas por los linfocitos B en respuesta un antígeno (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2014).

Antígeno: son todas las estructuras moleculares producidas por microbios o sustancias no infecciosas, que pueden ser reconocidas por el sistema inmune adaptativo y provocar una respuesta con generación de anticuerpos (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2014).

Autosómica dominante: se refiere a la herencia recibida de genes de cromosomas no sexuales y dominante porque de expresa tanto en heterocigotos como homocigotos (ADAM. Inc, 2019) .

Células endoteliales: son células que forman una capa que separa a la sangre de otros tejidos, de esta manera constituyen el sistema circulatorio que incluye arterias, venas y capilares y realizan funciones necesarias para la biología vascular (Carvajal, 2017).

Centrífuga: es un instrumento de laboratorio que produce movimientos de rotación a diferentes velocidades, con el fin de separar los componentes de una sustancia, en los laboratorios se utiliza para separar o sedimentar líquidos y sólidos, como en la sangre. (Tp Laboratorio Químico, 2017).

Control normal y patológico: se llama control a un espécimen de composición conocida, que se usa para monitorear el proceso analítico. Para el control de calidad de los análisis de laboratorio se utiliza 2 o más niveles de control dependiendo de la prueba, el control normal es aquel con concentraciones del analito dentro del intervalo de referencia (población sana), el control patológico tiene concentraciones del analito en intervalos superiores o inferiores al intervalo de referencia, estos intervalos son establecidos por puntos de decisión médica (Carmona, 2018).

Cuerpos de Weibel Palade: son gránulos de almacenaje que están presentes en las células endoteliales. Tienen como función principal almacenar y liberar Factor de von Willebrand y p-selectina que actúan en la hemostasia e inflamación (Centro Nacional de información de ciencias médicas, 2018).

Densidad óptica: es la absorbancia o cantidad de radiación que se absorbe, por la unidad de longitud que recorre la luz al pasar por una sustancia (Vidal & Vargas, 2014)

Electroforesis: técnica de laboratorio en la que se utiliza corriente eléctrica para separar sustancias como ácidos nucleicos o proteínas el desplazamiento de la sustancia va a depender de su tamaño y carga eléctrica. Sirve para el diagnóstico de varias enfermedades (Instituto Naciona del Cáncer, 2017).

Factor VIII: es un factor de la coagulación, una proteína en la sangre que controla sangrados. Es el factor deficiente en la hemofilia A (Federación Mundial Hemofilia, 2012).

Factor de von Willebrand: es un factor de la coagulación que participa en la hemostasia primaria (Woods, Blanco, Kempfer, Paiva, & Bermejo, 2016).

Gen: es la unidad básica de la herencia, está formado por una parte de la molécula de ADN. Los genes se colocan uno después de otro hasta completar la molécula de ADN y forman los cromosomas (National Human Genome Research Institute , 2019).

Hemostasia: se llama así al conjunto de procesos fisiológicos destinados a la detención de una hemorragia. Se da en dos partes hemostasia primaria donde se forma el tapón plaquetario y hemostasia secundaria donde el fibrinógeno se transforma en fibrina que forma una red que cubre al coágulo primario (Universidad de Cantabria, 2017).

Metaloproteasa: es un tipo de enzima que puede descomponer proteínas, además necesita de cinc o calcio para desempeñar sus funciones correctamente y de ahí su nombre metaloproteasa (Instituto Nacional del Cáncer, 2019).

Plaqueta: es un fragmento celular de células llamadas megacariocitos que se encuentran en la médula ósea. Las plaquetas están en la sangre y también se almacenan en el bazo, participan en la formación de coágulos para controlar sangrados y facilitar la cicatrización (Instituto Nacional del Cáncer, 2017).

Plasma sanguíneo: es la parte líquida, clara, amarillenta de la sangre que ayuda al transporte de la parte celular así como de las proteínas (Instituto Nacional del Cáncer, 2017).

Proteólisis: es la degradación de proteínas en los aminoácidos que la conforman. La proteólisis puede darse mediante enzimas específicas conocidas como proteasas o por digestión intramolecular (Lumitos AG, 2017).

Ristocetina: antiguamente fue un antibiótico obtenido de un caldo de fermentación de Nocardia liruda, se usaba contra cocos gram-positivos. Pero actualmente se usa en pruebas de función plaquetaria por su propiedad de agregar plaquetas (Favaloro, 2014).

Trombocitopenia: es la disminución de la cantidad de plaquetas/trombocitos en la sangre. Puede presentarse por falta de producción, aumento en la destrucción o acumulación en el bazo (Kuter, 2018).

Tubo con citrato de sodio: son tubos para la extracción de sangre que contienen citrato de sodio líquido como anticoagulante de la muestra cuando se va a realizar pruebas de coagulación (BD Vacutainer, 2019).

Turbidimetría: es un método analítico que se basa en la dispersión de la luz, se utiliza para determinar la concentración de partículas dentro de un fluido (Real Academia de Ingeniería, 2019).

CAPÍTULO III

3.1. MARCO METODOLÓGICO

3.1.1. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1.1. Tipo de Estudio

Este estudio fue de tipo observacional analítico transversal y correlacional, observacional porque el investigador no manipuló ninguna variable solo realizó un registro de los datos obtenidos, se hizo un análisis estadístico para ver si hay relación entre las variables y se interpretó los resultados, fue transversal porque las mediciones se hicieron una sola vez en el tiempo y fue correlacional porque se logró conocer si hay una relación entre los grupos ABO de los pacientes y los niveles de factor de von Willebrand.

3.1.1.2. Tipo de Muestreo

Para el presente trabajo se realizó un muestreo probabilístico aleatorio simple, porque todos los individuos de la población con diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand y trastornos de la coagulación tuvieron la misma posibilidad de participar en el estudio.

3.1.1.3. Tamaño de Muestra

La población ecuatoriana total es 16 889 670 aproximadamente, según la revisión mundial de prospectos poblacionales de 2017, hecha por el departamento de asuntos económicos Naciones Unidas (United Nations, 2017). Se estima una prevalencia del 1% para la enfermedad de von Willebrand (CDC, 2019). Basándose en estos datos se estimó una población ecuatoriana con enfermedad de von Willebrand de:

$$Pob.ecuatoriana\ con\ EvW = \frac{16\,889\,670\ \times 1}{100} = 168\,896\ personas$$

$$n = \frac{N\ \times Z_{\propto}^{2}\ \times p \times q}{d^{2}\ \times (N-1) + Z_{\propto}^{2} \times p \times q}$$

N Población	168 896
Z_{α} Z del nivel de confianza	95%→ Z=1.96
p Prevalencia asumida	50%=0.50
q 1-p	1-0.50= 0.50
d Precisión	0.056

$$n = \frac{168\,896 \times 1.96^{2} \times 0.50 \times 0.50}{0.056^{2}\ \times (168\,895) + 1.96^{2} \times 0.50 \times 0.50} = \frac{162\,207.71}{529.65 + 0.96} = 305$$

$$\boldsymbol{n} = 305$$

3.1.1.4. Hipótesis:

H0: Los pacientes con grupo sanguíneo O no presentan niveles del FvW con comportamiento diferente a los pacientes con grupo sanguíneo A o B.

H1: Los pacientes con grupo sanguíneo O presentan niveles del FvW con comportamiento diferente a los pacientes con grupo sanguíneo A o B.

3.1.1.5. Criterios de Inclusión

Personas diagnosticadas con enfermedad de von Willebrand.
Personas que aceptaron participar en la investigación, que firmaron el consentimiento informado y asentimiento informado en caso de menores de edad.

3.1.1.6 Criterios de Exclusión

Mujeres embarazadas o pacientes que toman anticonceptivos.

3.1.1.7 Análisis Estadístico

Para realizar la correlación de los datos se utilizó el programa SPSS Stadistics V.025 para realizar la tabulación de los datos se utilizó estadística descriptiva y para analizar la relación entre las variables se calculó el estadístico chi cuadrado y el coeficiente de correlación de Spearman.

3.2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

3.2.1 Variable dependiente: Niveles del factor de von Willebrand

3.2.2 Variables independientes:

- Sexo
- Edad
- Sistema ABO
- Sistema Rh
- Niveles de factor FVIII
- Actividad del cofactor ristocetina

CUADRO DE OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable dependiente	**Categoría**	**Definición Conceptual**	**Indicador**	**Tipo de variable**	**Escala de medición**	**Instrumento de medición**
Niveles del factor de von Willebrand	Cuantitativa	Glicoproteína con alto peso molecular	Estadística descriptiva frecuencias	Cuantitativa discreta	Porcentaje	Pruebas inmunoturbidimétricas
Variable independiente	**Categoría**	**Definición Conceptual**	**Indicador**	**Tipo de variable**	**Escala de medición**	**Instrumento de medición**
Sexo	Hombre Mujer	Conjunto de características físicas innatas, que diferencian dos grupos	Estadística descriptiva frecuencias	Cualitativa dicotómica	Nominal	Encuesta
Edad	<10 10-20 21-30 31-40 >40	Años transcurridos de vida	Estadística descriptiva frecuencias	Intervalo	Rango	Encuesta
Sistema ABO	A, B, AB, O	Identificación por antígenos ABO presentes en los eritrocitos	Estadística descriptiva frecuencias	Cualitativa polinómica	Nominal	Pruebas inmunohematológicas
Sistema Rh	Positivo Negativo	Identificación por antígenos tipo Rh presentes en los eritrocitos	Estadística descriptiva frecuencias	Cualitativa dicotómica	Nominal	Pruebas inmunohematológicas
Niveles de Factor VIII	Cuantitativa	Niveles plasmáticos del factor VIII	Estadística descriptiva	Cuantitativa continua	Porcentaje	Pruebas inmunoturbidimétricas
Actividad del cofactor ristocetina	Cuantitativa	Prueba que mide la actividad del FvW con la glicoproteína plaquetaria Ib	Estadístico de Correlación	Cuantitativa continua	Unidades	Pruebas inmunoturbidimétricas

3.3. MATERIALES Y PROCESO

3.3.1. Materiales

- Tubos de ensayo de 5ml
- Pipetas Pasteur
- Gradilla para tubos
- Serófuga

3.3.2. Reactivos

- HumaType Anti-A
- HumaType Anti-B
- HumaType Anti-A,B
- HumaType Anti-D
- Diluyente LISS
- Kit vWF Ag para determinación del antígeno de von Willebrand
- Tampón Veronal Owren
- Reactivo BC de von Willebrand/ BC vWF Reagent (para CoR)
- Plasma control N (Normal)
- Plasma control P (Patológico)
- Células comerciales para ABO y Rh

3.3.3. Control de Calidad

- *Reactivos*: se revisó el mantenimiento de la cadena de frío de acuerdo a los parámetros del fabricante, integridad de los reactivos, fechas de caducidad y revisión de las características físicas de acuerdo al inserto de la casa comercial.
- *Calibraciones*: se solicitó a la casa comercial la verificación y calibración de los equipos a ser utilizados en la investigación.

- *Reactivos para tipificación sanguínea ABO y Factor Rh:* Se realizó la determinación de la avidez, especificidad y potencia de cada uno de los reactivos de acuerdo con el Manual Técnico de la Asociación Americana de Bancos de Sangre (AABB, 2012). Se utilizó células comerciales de grupos sanguíneo A, B, O en cada prueba de tipificación y prueba de coombs indirecto para confirmación del factor Rh en caso de identificar pacientes portadores del antígeno D débil.

3.4. PROCEDIMIENTO

Ese estudio se realizó en seis fases:

3.4.1. Fase Uno:

La presente tesis es derivada del proyecto 'Diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand en ocho provincias del Ecuador y su relación con trastornos hemorrágicos en el período 2018-2019 Código 013036' y se requirió de las siguientes autorizaciones:

Autorización del CEISH: se envió la propuesta de investigación al CEISH-PUCE para su respectiva revisión y autorización. El proyecto se codificó como 2018-21-MB y fue aprobado definitivamente en la sesión del 28.02.2019 mediante el oficio-CEISH-684-2019 emitido en 11.03.2019.

Consentimiento informado y asentimiento informado: se envió conjuntamente con la propuesta de investigación al CEISH para su aprobación.

Aprobación del protocolo del Ministerio de Salud: luego de obtener la aprobación del plan del trabajo de titulación y CEISH-PUCE se procedió con el envío de la documentación al Ministerio de Salud Pública. El proyecto fue codificado como MSPCURI000291-3 y fue aprobado mediante el oficio Nro. MSP-DIS-2019-0190-O emitido el 30.04.2019.

Obtención de certificados de calibración: se solicitó a la casa comercial que realice la calibración de los equipos a ser utilizados en la investigación, para obtener los certificados de calibración respectivos.

3.4.2. Fase Dos:

Capacitación: se asistió al curso de capacitación organizado por la directora del proyecto 'Diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand en ocho provincias del Ecuador y su relación con trastornos hemorrágicos en el período 2018-2019 Código 013036' acerca de las pruebas diagnósticas en el mes de septiembre-octubre 2018.

Utilización del equipamiento: se realizó la calibración cada vez que se realice una corrida de muestras según como lo indica el manual de uso del equipo y tomando en cuenta también los requerimientos de cada prueba que vienen en los insertos.

3.4.3. Fase Tres:

Consentimiento Informado y asentimiento informado: Los pacientes con diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand fueron citados a través de la Fundación Hemofílica Ecuatoriana (FUNDHEC), la comunicación de los pacientes y el presidente de la Fundación fue vía electrónica (e-mails) o telefónica ya que los datos de contacto son manejados únicamente por los miembros del directorio de la fundación y sus núcleos. Para los pacientes menores de edad se contactó a los padres o representantes legales.

Se estableció un calendario conjuntamente con el presidente de la Fundación para establecer el lugar, hora, día y fecha al que acudieron los pacientes a los diferentes núcleos para la explicación del estudio sus beneficios y riesgo, así como el procedimiento de toma de muestra y la entrega de los resultados. Los pacientes fueron citados según la provincia donde residen de la siguiente manera: núcleo Pichincha (pacientes de Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas), núcleo Guayas (pacientes de Guayas), núcleo Centro (pacientes de Cotopaxi), núcleo Austro (pacientes de Azuay, Loja y El Oro), núcleo Manabí (pacientes de Manabí). Después de recibir la información los pacientes, padres o representantes pudieron hacer preguntas y se les pidió que firmen los consentimientos y asentimientos informados según sea el caso (Anexo A, B y C).

Toma de muestra: luego de la firma del consentimiento informado y aceptación de participar se procedió a la toma de dos muestras sanguíneas por sistema al vacío o jeringuilla en caso de niños o personas con venas delgadas. Se tomaron dos tubos, uno en EDTA (3ml adultos y 1ml niños) y otro con citrato de sodio 0,109 molar (4ml para adultos y 2ml niños).

El tubo con EDTA se almacenó y transportó a 4°C para poder realizar la tipificación del grupo sanguíneo. No se congeló (Martí, Abril, & Bosch, 2015).

El tubo con citrato fue centrifugado de forma inmediata a temperatura ambiente y no más de 3 500 rpm para preservar el plasma en alícuotas de 500µl y colocarlo a -22°C para mantener cadena de frío, finalmente se almacenó en ultracongeladora a -85°C hasta su procesamiento para las pruebas de FvW, FVIII y cofactor ristocetina.

Para la toma de muestra sanguínea se siguió las normas CLSI 2007, 2008a, 2008b (Anexo F). Estas normas mencionan: De ser posible, deberá extraerse sangre venosa del pliegue del codo con la ayuda de un torniquete para facilitar la extracción. El torniquete debe aplicarse justo antes de la extracción, no debe permanecer por mucho tiempo y debe ser colocado cuatro dedos arriba del pliegue del codo. La aguja no debe tener un calibre superior a 21 para adultos, y la muestra debe tomarse con una jeringa y/o con un sistema de extracción al vacío que permita la rápida extracción de la muestra de sangre. Para los niños, puede ser necesario utilizar una aguja de calibre 22 o 23.

Toda muestra que no se obtenga de manera rápida mediante una punción venosa que resulte satisfactoria de inmediato deberá desecharse para evitar la posible activación de la coagulación. Algunos autores recomiendan no utilizar los primeros 5 ml de sangre extraída para los análisis de hemostasia" (Federación Mundial de Hemofilia, 2010).

Validación de la fase preanalítica: Antes del uso de cualquier muestra, esta fue inspeccionada y desechada si se encontraba material particulado en ella, lo que sucede, por ejemplo, cuando no ha sido mezclada correctamente con el anticoagulante. El recipiente de la muestra (tubo vacutainer) no debe provocar activación por contacto (es decir, por lo que se utilizó recipientes de plástico o cristal siliconizado). Si el paciente presenta un hematocrito bajo o, en particular, si

el hematocrito es elevado, los resultados pueden verse afectados; por ello, el volumen de anticoagulante y sangre fue correcto.

Tabla 3.1: Validación de muestras

Validación de muestras pre-análisis		
	Cumple	No cumple
Tubo con EDTA (fecha de caducidad)		
Muestra sin coágulos		
Temperatura de almacenamiento a 4°C		
Volumen suficiente de muestra		
Plasma libre de glóbulos rojos		
Plasma sin contaminantes visibles		
Plasma separado en menos de 1 hora		
Mantenimiento del plasma a -20°C		

Autor: Josselyn Proaño

Codificación de muestras: se asignó un código alfanumérico a cada una de las muestras para mantener la confidencialidad de los pacientes. Se creó una base de datos en Excell a la que solo tuvo acceso la directora del estudio.

Transporte de muestras: los protocolos establecidos por la OMS para transporte de muestras biológicas es mantener una temperatura de 4-7°C para sangre y -20°C para plasma, se mantuvo un monitoreo de temperatura durante el transporte. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio de Investigación de la Carrera de Bioquímica Clínica de la PUCE de acuerdo a la instrucción 650 reconocida por IATA:

- Un recipiente primario: Crioviales de 2,5 ml
- Un embalaje/envasado secundario: Criocajas en contenedores de espumaflex
- Uso de pilas de congelación y un termómetro
- Un embalaje/envasado exterior rígido: Cooler

3.4.4. Fase Cuatro:

Tipificación de sangre: se realizó la tipificación del grupo sanguíneo por la técnica de aglutinación en tubo siguiendo los lineamientos del Manual Técnico de la Asociación Americana de Bancos de Sangre 2012 (Anexo G).

Determinación del Antígeno del Factor de von Willebrand: en el presente estudio se utilizó el método de inmunoturbidimetría para la determinación del antígeno de von Willebrand. Para este proceso se colocó la muestra de plasma que contiene el FvW junto con el reactivo que contiene partículas de poliestireno recubiertas con anticuerpos; los anticuerpos específicos se unen al FvW por medio de uniones covalentes, posteriormente se midieron la aglutinación por turbidimetría, determinando la turbidez que en este caso se comporta directamente proporcional a la concentración de FvW. El kit de la prueba contiene reactivo látex, diluyente y buffer. El reactivo látex consiste en una suspensión de partículas de poliestireno cubiertas con anticuerpos de conejo; el diluyente para el reactivo de látex es una solución de glicina; el buffer también es de glicina; y los tres tienen como conservante la azida sódica (SIEMENS , 2017)(Anexo H).

3.4.5. Fase cinco:

Inactivación de muestras: Se tomó en consideración los lineamientos establecidos por la Organización Mundial de la Salud Inactivación para ensayos clínicos: Se recomienda la inactivación por calor a 60°C durante 60 min para las muestras séricas u otros fluidos orgánicos; el calentamiento no afecta significativamente las estimaciones de electrolitos (sodio, potasio, magnesio) así como de urea, uratos, creatinina, bilirrubinas, glucosa y proteína C reactiva. Sin embargo, estudios han demostrado que enzimas como la fosfatasa alcalina y las transaminasas se inactivan o en cualquier caso se altera su determinación. Esta temperatura puede alterar también los ensayos serológicos (determinación de anticuerpos)" (OMS, 2015).

Eliminación de muestras biológicas: posterior a la inactivación de las muestras se eliminaron en contenedores enviados como desechos infecto contagiosos. Los

desechos infecciosos se colocaron en recipientes plásticos de color rojo con fundas plásticas de color rojo. Los desechos líquidos o semilíquidos especiales se colocaron en recipientes resistentes plásticos y con tapa hermética, para su tratamiento en el lugar de generación (MSP & Ministerio del Ambiente, 2014).
En el caso de los materiales reembolsables como tubos de vidrio u otros materiales, se utilizó la autoclave para realizar la esterilización del material.
No se conservó ninguna muestra.

3.4.6. Fase seis:

Para el acceso a los datos obtenidos de la encuesta estructurada realizados en el proyecto “Diagnóstico de la enfermedad de Von Willebrand en ocho provincias del Ecuador y su relación con los trastornos hemorrágicos en el periodo 2018-2019 Código 013036” se solicitó la autorización de los pacientes y la directora del proyecto de investigación para acceder a la información y se relacionó con las variables de este estudio.

Base de datos: en el archivo de Excel se recolectaron los datos requeridos para el análisis, el acceso fue a través de claves que se mantendrán por un lapso de 7 años.
Dentro de la base de datos están incluidos también los datos obtenidos de las entrevistas estructuradas a los pacientes con la finalidad de establecer la existencia de comorbilidades.

Análisis estadístico: se utilizó el programa IBM-SPSS Stadistics V.025 mediante estadística descriptiva se describió las variables mientras que para determinar la relación se utilizó el estadístico del chi cuadrado y el coeficiente de Spearman, manteniendo un intervalo de confianza del 95% y un error alfa del 5%.
Los resultados obtenidos serán reportados al Ministerio de Salud Pública, a la Fundación Hemofílica Ecuatoriana (FUNDHEC) y a los pacientes.

CAPITULO IV

4.1 CONTROL DE CALIDAD

4.1.1 Tipificación ABO y Rh

Se utilizaron reactivos monoclonales de la casa comercial Antec, lote 170048, con fecha de caducidad 2020-06. Se utilizaron células comerciales A-B y Rh de BIORAD, lote 37005515201 con fecha de caducidad 2020-04-30 para el control de calidad de los reactivos. En este proceso se midió los parámetros de apariencia, especificidad, avidez y potencia (Tabla 4.1-4.3).

Tabla 4.1: Control de calidad apariencia

Grupo de pruebas	Anti-A		Anti-B		Anti-AB		Anti-D	
	Turb.	**Part.**	**Turb.**	**Part.**	**Turb.**	**Part.**	**Turb.**	**Part.**
1	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
2	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
4	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
5	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
6	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
7	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
8	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
9	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
*Turb: turbidez; Part: partículas								
Frecuencia del control: cada grupo de pruebas								

Autor: Josselyn Proaño

Tabla 4.2: Control de calidad avidez y especificidad

Eritrocitos de grupo conocido al 10%	Reactivo Anti-A/ tiempo aglutinación	Reactivo Anti-B/ tiempo aglutinación	Reactivo Anti-AB/ tiempo aglutinación	Reactivo Anti A1/ tiempo aglutinación	Reactivo Anti-D/ tiempo aglutinación
A1 Rh (+)	6 seg.	Sin aglutinación	3 seg.	4 seg.	13 seg.
B Rh (+)	Sin aglutinación	3 seg.	4 seg.	Sin aglutinación	14 seg.
O Rh (+)	Sin aglutinación	Sin aglutinación	Sin aglutinación	Sin aglutinación	13 seg.
O Rh (-)	Sin aglutinación	Sin aglutinación	Sin aglutinación	Sin aglutinación	Sin aglutinación
Frecuencia del control: cada lote nuevo					

Autor: Josselyn Proaño

Tabla 4.3: Control de calidad Potencia

Eritrocitos de grupo conocido al 5%	Anti-A								
Título	**1/2**	**1/4**	**1/8**	**1/16**	**1/32**	**1/64**	**1/128**	**1/256**	**1/512**
A1	++++	+++	+++	++	++	++	+	+	+
	Anti-A1 lectina								
A1	++++	+++	+++	++	++	+	+	-	-
	Anti-B								
B	++++	++++	+++	+++	+++	++	+	+	+
	Anti- AB								
A1	++++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-
B	++++	++++	+++	+++	+++	++	+	+	-
	Anti-D								
Rh (+)	++++	+++	+++	++	++	+	-	-	-
Frecuencia del control: cada nuevo lote									

Autor: Josselyn Proaño

4.1.2 Determinación de Factor de von Willebrand

El aseguramiento de la calidad de los resultados obtenidos al medir el FvW Ag se realizó mediante la elaboración de las curvas de calibración para cada lote de reactivo (Tabla 4.4 y 4.6) (Gráfico 4.1 y 4.2), para ello se utilizó el Standard Human plasma lote 503267 con fecha de caducidad 12/04/2020, manteniendo las diluciones programadas en el equipo.

Para la determinación del factor de von Willebrand se utilizó el kit de ensayo FvW Ag de la marca Siemens, lote 533003 con fecha de caducidad 31/01/2020 y lote 533004 con fecha de caducidad 30/04/2020 y las pruebas se realizaron en el coagulómetro Sysmex CA 660.

Adicionalmente se utilizaron controles normal y patológico de marca Siemens para cada corrida de pruebas. Y los resultados fueron aceptados basándose en los valores de referencia encontrados en los insertos de los controles (Tabla 4.5 y 4.7).

Tabla 4.4: Datos primera curva de calibración FvW

Fecha	12/07/2019
Densidad óptica	**% FvW**
0,0000	0,0
0,0064	13,3
0,0148	26,5
0,0345	53,0
0,0806	106,0
0,1551	212,0

Autor: Josselyn Proaño

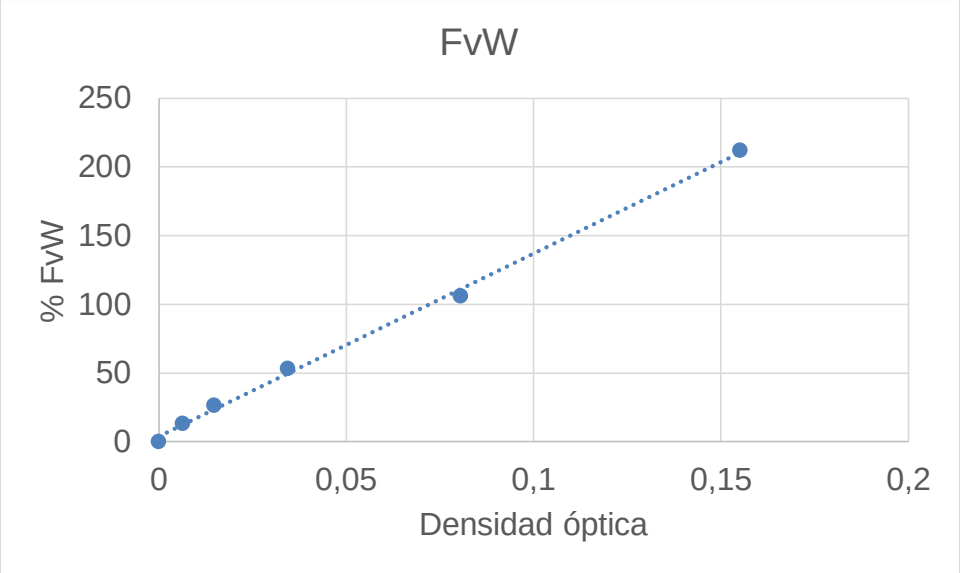


Gráfico 4.1: Primera curva calibración de FvW

Autor: Josselyn Proaño

Tabla 4.5: Controles normal y patológico para primer lote de FvW

	Corrida	Resultado vWF%	Valor de referencia
Control Normal Lote: 507768 Cad: 04/06/2021	1	110,0	97-145%
	2	113,5	
	3	113,0	
	4	113,5	
Control Patológico Lote: 556715 Cad: 27/01/2021	1	45,1	32-54%
	2	46,8	
	3	44,3	
	4	45,8	

Autor: Josselyn Proaño

Tabla 4.6: Datos segunda curva de calibración FvW

Fecha	08/08/2019
Densidad óptica	**% FvW**
0,0000	0,0
0,0075	13,3
0,0183	26,5
0,0410	53,0
0,0872	106,0
0,1657	212,0

Autor: Josselyn Proaño

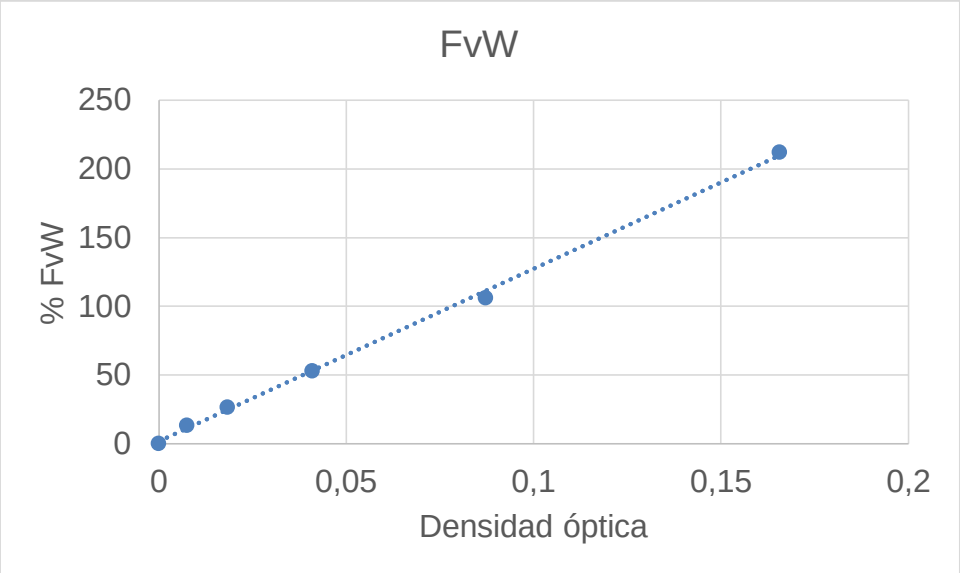


Gráfico 4.2: Segunda curva de calibración de FvW

Tabla 4.7: Controles normal y patológico para segundo lote de FvW

	Corrida	Resultado FvW%	Valor de referencia
Control Normal Lote: 507768 Cad: 04/06/2021	1	114,2	97-145%
	2	118,7	
	3	126,1	
	4	126,1	
Control Patológico Lote: 556715 Cad: 27/01/2021	1	42,1	32-54%
	2	44,4	
	3	45,5	
	4	43,9	

Autor: Josselyn Proaño

4.1.3 Determinación de Factor FVIII

Se utilizó el Standard Human plasma lote 503267 con fecha de caducidad 12/04/2020 para las calibraciones de cada lote de reactivos, de igual manera se utilizó las diluciones programadas en el equipo (Tabla 4.8 y 4.10) (Gráfico 4.3 y 4.4).

En cada corrida de pruebas para FVIII se utilizaron controles de 2 niveles de marca Biorad lote 78490 caducidad 31/08/2021, para probar el Actin y el cloruro de calcio con la prueba de TTP. Los controles utilizados fueron normal y patológico de marca Siemens para FVIII. Y los resultados fueron aceptados basándose en los valores de referencia encontrados en los insertos de los controles (4.9 y 4.11). También se utilizó plasma deficiente de factor VIII de la marca Siemens, lote 547674 con fecha de caducidad 20/01/2020 y lote 547676 con fecha de caducidad 24/10/2020, y tampón veronal Owren lote 554669 con caducidad 08/05/2021; Actin lote 557601 con fecha de caducidad 22/01/2021 y cloruro de calcio lote 563860 con fecha de caducidad 08/04/2024 en el coagulómetro Sysmex CA 660.

Tabla 4.8: Datos primera curva de calibración FVIII

Fecha	20/06/2019
Segundos	**% FVIII**
82,3	11,8
72,9	23,5
63,6	47,0
55,4	94,0
50,9	141,0

Autor: Josselyn Proaño

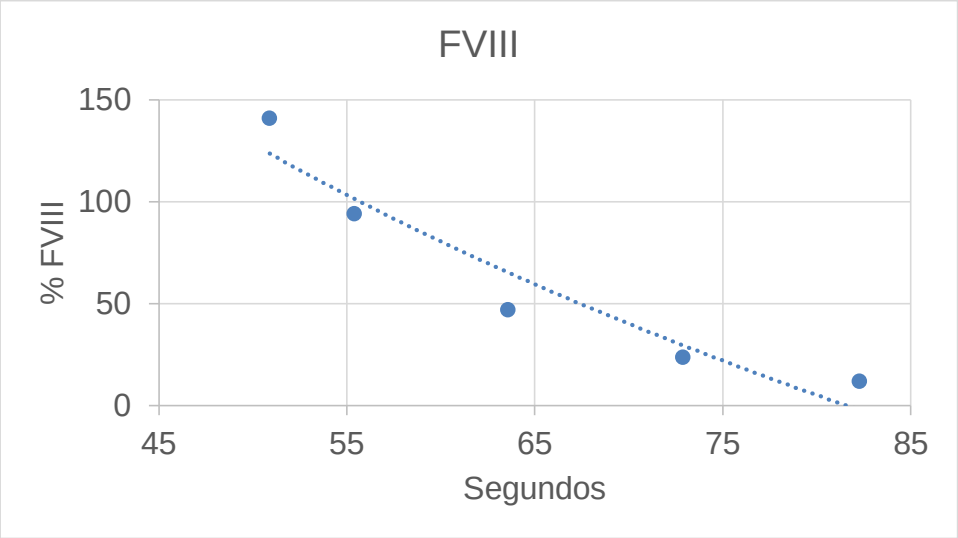


Gráfico 4.3: Primera curva de calibración de FVIII

Autor: Josselyn Proaño

Tabla 4.9: Controles para FVIII para la primera curva

	Corrida	Resultado TTP	valor de referencia
Control 1 lote: 78491 cad: 31/08/2021	1	25,9	25,0-32,37 seg.
	2	24,0	
	3	25,8	
	4	25,6	
Control 2 lote: 78492 cad: 31/08/2021	1	93,2	76,61-100,43 seg.
	2	96,3	
	3	84,4	
	4	83,3	
	Corrida	Resultado FVIII	valor de referencia
Control Normal lote: 507756 cad: 04/06/2021	1	96,2	75-113%
	2	94,6	
	3	81,1	
	4	89,9	
Control Patológico lote: 556708 cad: 27/01/2021	1	27,2	20-34%
	2	29,6	
	3	28,6	
	4	30,2	

Autor: Josselyn Proaño

Tabla 4.10: Datos segunda curva de calibración FVIII

Fecha	08/08/2019
Segundos	**% FVIII**
95,3	11,8
83,4	23,5
73	47,0
64,2	94,0
58,3	141,0

Autor: Josselyn Proaño

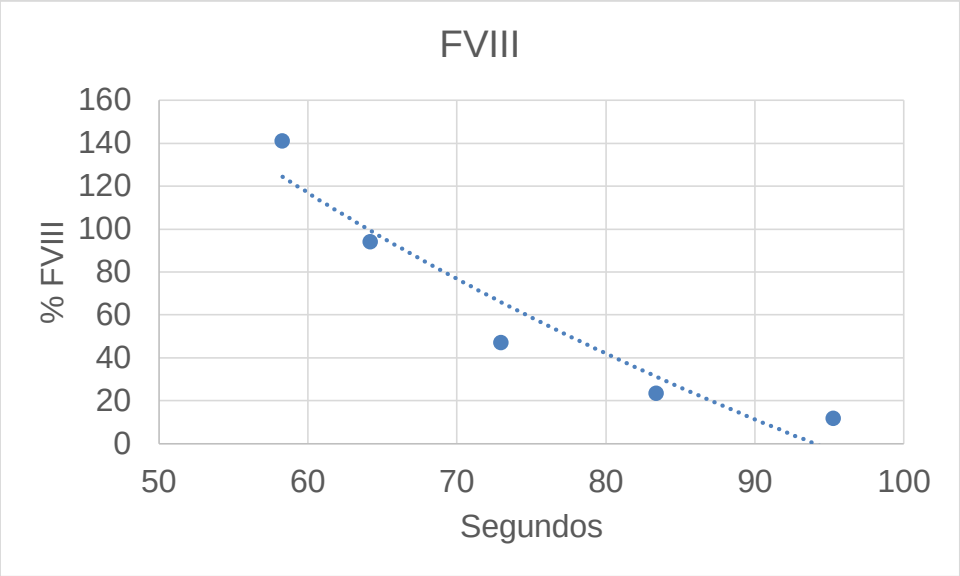


Gráfico 4.4: Segunda curva de calibración para FVIII

Autor: Josselyn Proaño

Tabla 4.11: Controles para FVIII para la segunda curva

	Corrida	Resultado TTP	Valor de referencia
Control 1 lote: 78491 cad: 31/08/2021	1	27,1	25,0-32,37 seg.
	2	26,0	
Control 2 lote: 78492 cad: 31/08/2021	1	82,5	76,61-100,43 seg.
	2	90,2	
	Corrida	Resultado FVIII	Valor de referencia
Control Normal lote: 507768 cad: 04/06/2021	1	98,4	75-113%
	2	99,8	
Control Patológico lote: 556715 cad: 27/01/2021	1	32,4	20-38%
	2	32,9	

Autor: Josselyn Proaño

CAPITULO V

5.1. RESULTADOS

5.1.1. Descripción de la Población de Estudio

Para el presente estudio se obtuvo un tamaño muestral de 305 pacientes presuntivos o que fueron diagnosticados anteriormente con la enfermedad de von Willebrand tomando como referente la prevalencia mundial del 1% ya que en el país no está disponible este dato. Acudieron al estudio pacientes que mencionaron tener la enfermedad y sus familiares, al tratarse de una patología relacionada con la herencia se aceptaron de forma aleatoria a las personas que acudieron. Seguidamente se realizó las pruebas utilizadas en el país para diagnosticar la enfermedad, confirmándose que 64 individuos presentan la enfermedad de von Willebrand, el resto fue eliminado del estudio.

El grupo de pacientes confirmados con enfermedad von Willebrand estuvo formado por 27 hombres que corresponden al 42% y 37 mujeres que representan el 58% (Tabla 5.1).

Tabla 5.1: Distribución de género

Género	Pacientes	%
Femenino	37	58%
Masculino	27	42%
Total	64	100%

Autor: Josselyn Proaño

Los pacientes tenían edades comprendidas entre 2-80 años, fueron clasificados en 5 grupos: <10; 10-20; 21-30; 31-40 y >40. El grupo etario más frecuentes fue > 40 con 19 pacientes que representan el 29,7% (Tabla 5.2).

Tabla 5.2: Distribución por grupo etario

Grupo etario	Pacientes	%
<10	10	15,6 %
10-20	13	20,3 %
21-30	10	15,6 %
31-40	12	18,8 %
>40	19	29,7 %
Total	64	100 %

Autor: Josselyn Proaño

Los pacientes eran oriundos de ocho provincias ecuatorianas y su distribución fue heterogénea siendo la de mayor frecuencia en Pichincha con 42,2% y Guayas con 20,3% (Tabla 5.3).

Tabla 5.3: Distribución por procedencia

Provincia	Pacientes	%
Azuay	9	14,1%
Cotopaxi	2	3,1%
El Oro	9	14,1%
Guayas	13	20,3%
Loja	1	1,6%
Manabí	2	3,1%
Pichincha	27	42,2%
Santo Domingo	1	1,6%
Total	64	100%

Autor: Josselyn Proaño

5.1.2. Determinación de Factor von Willebrand

Posterior a la determinación del antígeno de von Willebrand se encontró que todos los pacientes tenían resultados menores al rango de referencia de la población en general (50-160%), obtenido del inserto de la casa comercial y tomando en cuenta la metodología usada para la prueba (SIEMENS , 2017). Estos resultados confirmaron el diagnóstico de los pacientes.

Se realizó la estadística descriptiva de los datos, se obtuvo una media de 23,69% de FvW, con una desviación estándar de 15,87. El resultado más bajo obtenido fue de 0,60% y el valor más alto fue 49,10% (Tabla 5.4).

Tabla 5.4: Estadística descriptiva de los datos de FvW

Estadísticos descriptivos						
	N	Rango	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
FvW	64	48,50	0,60	49,10	23,69	15,87
N válido	64					

Autor: Josselyn Proaño

Tomado en cuenta la variabilidad de resultados y para facilitar su comprensión se decidió clasificar los resultados del factor en 4 categorías de acuerdo con los niveles de antígeno de von Willebrand obtenidos en las pruebas de laboratorio así: 30-49%; 15-29%; 10-14%, y <10%.

Se encontró que el 34% de pacientes presentó niveles del factor de Von Willebrand (FvW) entre 30-49%, seguido del 25%(16) con resultados <10%; 22% (14) entre el 15-29% y 19% (12) con valores de 10-14% (Tabla 5.5).

Tabla 5.5: Resultados de FvW por categorías

FvW	Frecuencia	%
30-49%	22	34%
15-29%	14	22%
10-14%	12	19%
<10%	16	25%
Total	64	100%

Autor: Josselyn Proaño

5.1.3. Determinación de Factor VIII

Se realizó la determinación de Factor VIII (FVIII) con las muestras de los 64 pacientes. La estadística descriptiva de los datos reveló una media de 36,17% de FVIII, con una desviación estándar de 33,12. Los resultados de los pacientes estuvieron entre 2,30 y 150,0% (Tabla 5.6)

Tabla 5.6: Estadística descriptiva de los datos de FVIII

Estadísticos descriptivos						
	N	Rango	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
Factor VIII	64	147,7	2,30	150,0	36,17	33,12
N válido	64					

Autor: Josselyn Proaño

Para facilitar la comprensión de los resultados se decidió clasificarlos en 3 categorías de acuerdo con los niveles de concentración obtenidas en las pruebas de laboratorio así: 50-150%; 6-49%; 1-5%.

Se encontró que 64% de los pacientes tuvo resultados de FVIII de 6-49%; 5% tuvo resultados 1-5% y 31% de los pacientes tuvieron resultados de 50-150% que se consideran normales en población sana; sin embargo si pueden presentarse en pacientes con enfermedad de von Willebrand de variantes cualitativas (Woods, Blanco, Kempfer, Paiva, & Bermejo, 2016) (Tabla 5.7).

Tabla 5.7: Resultados de FVIII

FVIII	Frecuencia	%
50-150%	20	31%
6-49%	41	64%
1-5%	3	5%
Total	64	100%

Autor: Josselyn Proaño

5.1.4. Frecuencia de Grupo ABO y Rh

En la población de estudio se identificó que el 78,1% de pacientes son de grupo sanguíneo O, 20,3% fueron tipificados como A y 1,6% como AB no se encontró ningún paciente con grupo B. En cuanto a la tipificación del sistema Rh el total de pacientes fue tipificado como Rh positivo (Tabla 5.8).

Tabla 5.8: Frecuencia de grupos ABO y Rh

Grupo	Rh	Pacientes	%
A	Positivo	13	20,3 %
AB	Positivo	1	1,6 %
O	Positivo	50	78,1 %
Total		64	100 %

Autor: Josselyn Proaño

Los individuos tipificados como A o AB también se les realizó la tipificación del subgrupo como A1 o A2, se observó una mayor frecuencia para el subgrupo A1 con el 72% (Tabla 5.9).

Tabla 5.9: Frecuencia de subgrupos de A

Subgrupo	Pacientes	%
A1	10	72%
A2	3	21%
A1B	1	7%
Total	14	100%

Autor: Josselyn Proaño

5.1.5. Análisis de las comorbilidades:

Basándose en información proporcionada por los pacientes no se encontró ninguna comorbilidad, algunos pacientes mencionaron tener o haber tenido anemia, sin embargo al ser una alteración que acompaña a la enfermedad de von Willebrand por los sangrados no se tomó como comorbilidad para esta población.

5.1.6. Relación Grupo ABO y Factor de von Willebrand

Para analizar la relación entre variables se utilizó las mismas 4 categorías usadas para presentar los resultados de las pruebas de laboratorio de FvW: 30-49%; 15-29%; 10-14%; y <10%. Se encontró que existe una alta prevalencia del grupo sanguíneo O en todas las categorías (Tabla 5.10) (Gráfico 5.1).

Tabla 5.10: Grupo ABO vs. FvW

	Factor de von Willebrand				
Grupo ABO	30-49%	15-29%	10-14%	<10%	Total
A	3	3	3	4	13
AB	0	0	1	0	1
O	19	11	8	12	50
Total	22	14	12	16	64

Autor: Josselyn Proaño

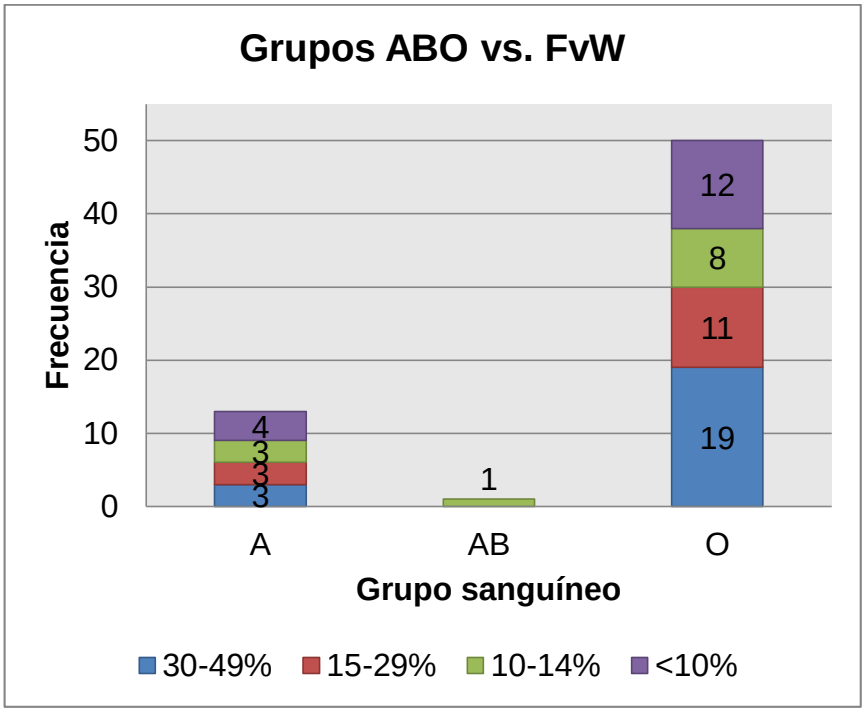


Gráfico 5.1: Grupos ABO vs Niveles del FvW

Autor: Josselyn Proaño

Usando estos datos se realizó una prueba de chi-cuadrado para la que se dividió los grupos ABO como: grupo O y los No-O donde se incluyó los grupos A y AB.
La significancia menor a 0,01 indica que hay diferencias altamente significativas entre ambos grupos O y No-O. Es decir que los pacientes con grupo O tienen más probabilidad de tener niveles más disminuidos de factor de von Willebrand en comparación a los individuos de grupo No-O, por lo que se acepta la *Hipótesis Alterna:* Los pacientes con grupo sanguíneo O presentan niveles del FvW con comportamiento diferente a los pacientes con grupo sanguíneo A o B (Tabla 5.11).

Tabla 5.11: Prueba de chi-cuadrado para grupos O y No-O

	N observado	N esperada	Residuo
Grupo No O	14	32,0	-18,0
Grupo O	50	32,0	18,0
Total	64		
Estadísticos de prueba			
	Grupo		
Chi-cuadrado	20,250[a]		
gl	1		
Sig. asintótica	0,00001		
a. 0 casillas (0,0%) han esperado frecuencias menores que 5. La frecuencia mínima de casilla esperada es 32,0.			

Autor: Josselyn Proaño

5.1.7. Relación grupo ABO y Factor VIII

Para comparar ambas variables se utilizó las mismas 3 categorías usadas para presentar los resultados de FVIII: 50-150%; 5-49%; 1-4%. De los 50 pacientes tipificados como O más de la mitad tuvo resultados entre 1-45% de FVIII, que son valores inferiores al valor de referencia de personas sanas. En pacientes con

grupo A la mayoría tuvo resultados de 5-49%. Pero también existieron 18 pacientes grupo O con valores entre 50-150%. (Tabla 5.12) (Gráfico 5.2).

Tabla 5.12: Grupo ABO vs. FVIII

Grupo ABO	50-150%	5-49%	1-4%	Total
A	2	11	0	13
AB	0	0	1	1
O	18	30	2	50
Total	20	41	3	64

Autor: Josselyn Proaño

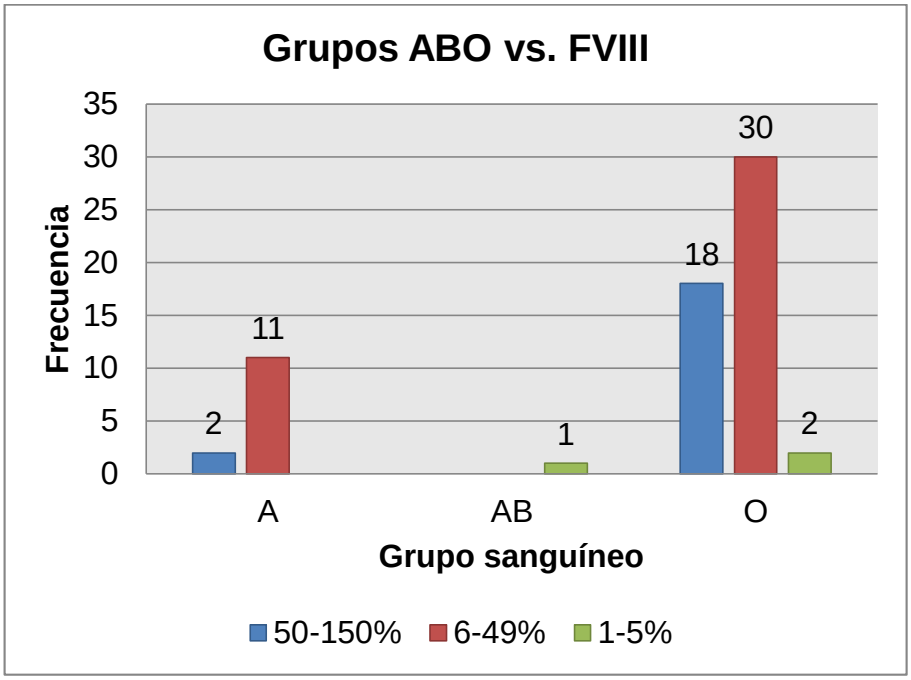


Gráfico 5.2: Grupo ABO vs. FVIII

Autor: Josselyn Proaño

Factor de von Willebrand y Factor FVIII

Primero se realizaron pruebas de normalidad con los datos que se obtuvo para elegir la manera más indicada de realizar la correlación de variables. Los resultados revelaron que los datos obtenidos no tenían una distribución normal, es decir que hay una diferencia altamente significativa entre los datos obtenidos y una distribución normal (Tabla 5.13). Por esta razón se eligió la correlación de Spearman para los análisis entre estas variables (Tabla 5.14).

Tabla 5.13: Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
FvW	0,129	64	0,010	0,918	64	0,0001
Factor VIII	0,153	64	0,001	0,834	64	0,0001
a. Corrección de significación de Lilliefors						

Autor: Josselyn Proaño

Tabla 5.14: Correlación de Spearman

			Factor VIII	FvW
Rho de Spearman	Factor VIII	Coeficiente de correlación	1,000	0,574**
		Sig. (bilateral)	.	**0,0001**
		N	64	64
	FvW	Coeficiente de correlación	0,574**	1,000
		Sig. (bilateral)	**0,0001**	.
		N	64	64
**. La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).				

Autor: Josselyn Proaño

Con los resultados de la correlación de Spearman se obtuvo un valor p menor de 0,01 que indica que la correlación es altamente significativa entre ambas pruebas, ambos niveles de factores en este caso. El valor obtenido de r de Spearman fue de 0,574 lo que indica que la correlación es positiva, es decir que cuando los niveles de factor de von Willebrand bajan los niveles de factor VIII también tienden a bajar.

5.1.8. Relación grupo ABO y la concentración del cofactor ristocetina

Los resultados fueron clasificados en las siguientes categorías: 58-172%; 30-57%; 10-29% y <10% con fines analíticos. El 71% de pacientes independientemente del grupo ABO tuvieron resultados menores de 10% de cofactor, de ellos 35 pacientes son de grupo O; 8 son A y 1 es AB ($p>0.05$). Dos pacientes poseen valores dentro de la media considerada normal (58-172%).

Tabla 5.15: Grupo ABO vs. Cofactor ristocetina

Grupo ABO	58-172%	30-57%	10-29%	<10%	Total
A	1	1	1	8	11
AB	0	0	0	1	1
O	1	10	4	35	50
Total	2	11	5	44	62*
%	3%	18%	8%	71%	100%

Autor: Josselyn Proaño

*Se realizó a un total de 62 pacientes debido a que las muestras de dos fueron catalogadas como insuficientes. (p>0.05) no existe una significancia estadística.

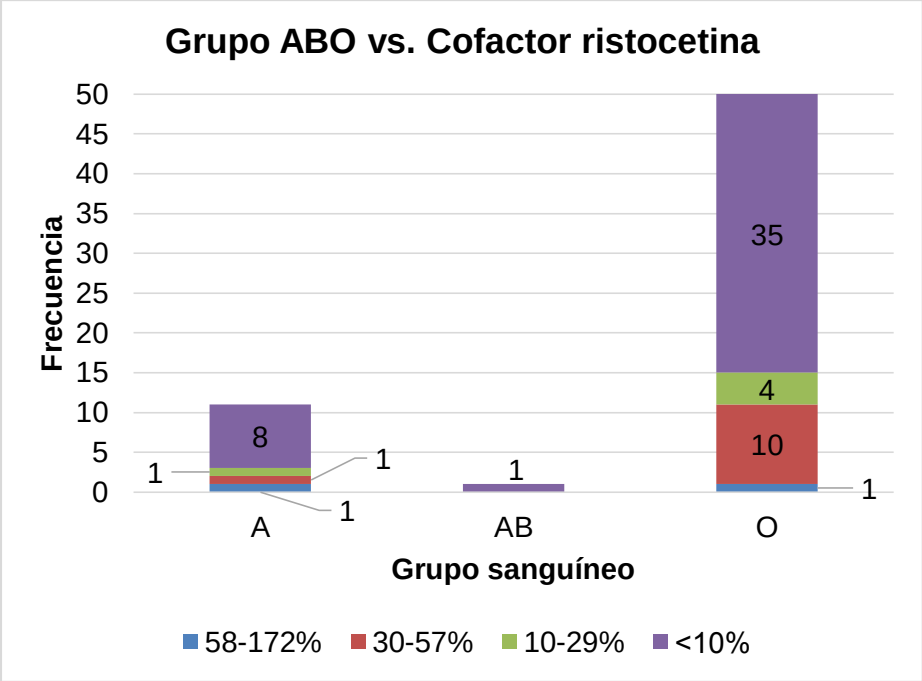


Gráfico 5.3: Grupo ABO vs. Cofactor ristocetina

5.2. DISCUSIÓN

Estudios han demostrado que el sistema sanguíneo ABO tiene influencia en diferentes mecanismos del organismo ya que sus antígenos no están limitados únicamente a los glóbulos rojos por lo que su importancia clínica ya no está enfocado únicamente a reacciones pos transfusionales (Franchini, Crestani, Frattini, Sissa, & Bonfanti, 2014). Investigaciones realizadas en poblaciones sanas han identificado que existe una relación del grupo ABO con la hemostasia, especialmente con la concentración o niveles del factor de von Willebrand (FvW), determinando que los individuos con grupo sanguíneo O tienden a presentar valores más bajos de FvW (Choi, Kim, & Kim, 2014) (Alharbi, Hassan, Al-Momen, & Al-Saleh, 2018), sin embargo no existe información acerca del fenotipo ABO y su relación en pacientes diagnosticados con la enfermedad de von Willebrand.

En Ecuador no existe un registro sólido acerca de la enfermedad de von Willebrand, ni siquiera aparece como tal en la base de datos de morbilidad en Ecuador (Ganoa, 2014). El diagnóstico de la enfermedad es difícil ya que no se basa en un solo parámetro, además hay diferentes tipos de la enfermedad que requieren de pruebas especiales para su clasificación (Woods, Blanco, Kempfer, Paiva, & Bermejo, 2016), estas son inexistentes en el país, tampoco existe una guía clínica publicada en las páginas del Ministerio de Salud Pública para el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand (MSP, 2019). Adicionalmente después de revisar datos del INEC se encontró que no hay suficientes profesionales hematólogos en el país y están distribuidos solamente en costa y sierra (INEC, 2016), todo esto dificulta el diagnóstico de la enfermedad y la determinación de su real prevalencia constituyendo un problema no solo de salud sino para fines investigativos como es la realización del cálculo de un tamaño muestral.

La muestra obtenida en este estudio fue de 64 pacientes con predominio del género femenino y pacientes > 40 años. Según la CDC la enfermedad de von Willebrand (VWD) afecta tanto a hombres como a mujeres sin embargo menciona que las mujeres tienen más probabilidad de notar los síntomas debido a los

sangrados del período menstrual y los sangrados después de dar a luz. Esta puede ser la razón por la que la son reclutadas más fácilmente para determinar la presencia de la enfermedad (CDC, 2019).

La procedencia de los participantes fue mayoritaria de la provincia de Pichincha y Guayas lo que fue esperado ya que son las dos más pobladas del país según datos del último censo (INEC, 2010). Además cuentan con hospitales especializados y acceso a médicos especialistas y pruebas de laboratorio que orientan el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand.

Al realizar la determinación de FvW los pacientes tuvieron resultados desde 49% hasta valores <10%, estos valores son menores al valor de referencia de población sana 50-150%, lo que concuerda con la descripción de la enfermedad. En cuanto a la determinación de FVIII se encontró que 64% de los pacientes tuvo 6-49% que son valores menores al rango de referencia para población en general que es de 50-150%; 31% de los pacientes tuvieron resultados de 50-150% que se consideran normales en población sana y 5% de los pacientes tuvieron resultados de 1-5%. Estos resultados también concuerdan con valores encontrados en pacientes con la enfermedad de von Willebrand, ya que dependiendo del tipo o variante de la enfermedad, los pacientes pueden presentar disminución del FVIII o tener valores normales (Woods, Blanco, Kempfer, Paiva, & Bermejo, 2016).

Respecto a los resultados de la prueba de cofactor ristocetina, que sirve para evaluar la funcionalidad del FvW, se obtuvo que el 71% de los pacientes independiente del grupo sanguíneo tuvieran resultados menores al 10%. El 18% presentó valores entre 30-57%; 8% valores de 10-29% y 3% tuvieron valores entre 58-172%, esta última categoría se considera valores normales para población sana. Estos resultados corresponden con la descripción de la enfermedad de von Willebrand que detalla que en la variante cuantitativa más frecuente se encuentran disminuidos el FvW:Ag y también el cofactor ristocetina, sin embargo hay variantes cualitativas de la enfermedad donde se pueden presentar resultados normales en la prueba del cofactor siendo menos frecuente (Woods, Blanco, Kempfer, Paiva, & Bermejo, 2016), lo que también concuerda con este estudio.

El análisis de las respuesta dadas por los pacientes en la encuesta estructurada se determinó que no mencionan comorbilidades únicamente hacen referencia de

haber tenido anemia sin embargo al ser un trastorno que puede presentarse por los sangrados propios de la enfermedad de von Willebrand, no se consideró como comorbilidad.

En estudios realizados en Ecuador principalmente en Quito se ha encontrado mayor frecuencia del grupo sanguíneo O, dependiendo del estudio el porcentaje de frecuencia varía entre 57-77%, le sigue en frecuencia el grupo A con 16-30%, B con 6-11%, AB con 0,62-1% (Ortiz, 2016) (Ulloa, 2013). En este estudio se encontró un 78,1% de pacientes con grupo O; 20,3% con grupo A; 1,6% con grupo AB y no se tuvo ningún caso con grupo B. Estos resultados concuerdan con estudios de frecuencia del grupo ABO realizados en población ecuatoriana.

En cuanto al Sistema Rh según datos de estudios realizados en Ecuador se ha encontrado una frecuencia de 91-94% Rh Positivo y 5-8% Rh Negativos (Ulloa, 2013) (Ortiz, 2016). En este grupo de estudio todos fueron tipificados como Rh positivo. Para los grupos A y AB se realizó además la tipificación del subgrupo de A, se obtuvo un 72% de A1; 21% de A2 y 7% de A1B. Estos resultados son comparables a valores obtenidos en otro estudio realizado en donantes de Ecuador donde encontró que los subgrupos de A en orden de mayor a menor frecuencia son: A1 con un 75%, A2 con 13% y A1B con 5,1% (Parra, 2014). Existen algunas variaciones en los porcentajes que pueden deberse a que en este estudio se trabajó con una población de pacientes con von Willebrand además hubo subgrupos que no se encontraron como el A2B.

Dentro de esta temática de los subgrupos, para estudios posteriores sería interesante investigar si las personas de este estudio tipificadas como A, B son homocigotos o heterocigotos ya que en un estudio realizado en población sana se encontró que los individuos heterocigotos tanto para A como B tuvieron niveles de FvW más bajos que aquellos homocigotos (Márquez, Lancheros, & Díaz, 2019).

Massimo Franchini and *et al,* mencionan que existe una estrecha interacción entre el grupo sanguíneo ABO y el FvW, en un estudio canadiense se determinó que pacientes con VWD tipo 1 con niveles >30UI/dL, el 66% fueron tipificados con el grupo sanguíneo O mientras que en la población normal el grupo O solo

representó el 46% (Franchini, Crestani, Frattini, Sissa, & Bonfanti, 2014), datos similares al presente estudio.

En otro estudio realizado en un multícentro europeo de diagnóstico, se evaluaron 42 casos con enfermedad de VWD tipo 1 determinando que el 76% pertenecían al grupo sanguíneo O, en comparación al 38% que fue el valor encontrado en población normal. Aquellos grupos de pacientes en los que se determinó una co-segregación incompleta con FvW, el 89% fueron tipificados como O, demostrándose una relación entre el grupo sanguíneo y los déficit del FvW (Franchini, Crestani, Frattini, Sissa, & Bonfanti, 2014).
En el presente estudio los análisis estadísticos obtuvieron un valor de $p < 0.001$ demostrando una diferencia significativa entre grupos sanguíneo O y No-O con individuos afectados por la VWD, es decir que los pacientes con grupo O tienen más probabilidad de tener niveles más disminuidos de factor de von Willebrand en comparación a los individuos de grupo No-O.

Investigaciones han identificado que el locus ABO es uno de los componentes genéticos que influye en los niveles plasmáticos y la eliminación de la proteína del FvW existiendo una concentración más baja del factor en comparación de los individuos con grupo No-O, incluso se ha establecido que los niveles de FvW es muy reducido en personas portadoras del raro grupo sanguíneo Bombay (Casari, Lenting, Wohner, Christophe, & Denis, 2013), estos antecedentes afirman los resultados encontrados en el presente estudio donde se encontró mayor frecuencia de pacientes con grupo sanguíneo O, al igual que Franchini and *et al,* que identificó mayor frecuencia de grupo sanguíneo O en pacientes con von Willebrand, sugiriendo que el grupo O podría favorecer a la expresión fenotípica de esta coagulopatía (Franchini, Crestani, Frattini, Sissa, & Bonfanti, 2014).

El estudio realizado en pacientes con cáncer de pulmón también estableció que los parámetros hemostáticos en aquellos con grupo sanguíneo No-O mostraron un aumento significativo de niveles plasmáticos de FvW y FVIII ($p=0.014$) en comparación con los de grupo O determinando así la influencia del grupo sanguíneo en la hemostasia (Liu, Chen, Yang, & Guo, 2017).

Los análisis estadísticos mostraron que en los pacientes con enfermedad de von Willebrand a pesar de la variabilidad que puede haber en los resultados de FVIII, debida a los diferentes tipos de la enfermedad, se mantiene una fuerte relación entre FvW y FVIII. La correlación de Spearman obtuvo un valor p menor de 0,01 que indica una correlación altamente significativa entre ambas pruebas. Se obtuvo un valor r de 0,574 lo que indica que la correlación es positiva, es decir que los niveles de factor de von Willebrand y factor VIII tienden a bajar o subir conjuntamente.

De los resultados obtenidos en esta investigación se deduce la importancia de estudios de prevalencia de la enfermedad, así como tener una especial atención en pacientes de grupo O que tienden a presentar menor nivel de Ag de vW para su seguimiento y mejora en la calidad de vida.

5.3. CONCLUSIONES

- En la población con diagnóstico de enfermedad de von Willebrand el 78,1% fue tipificado como grupo sanguíneo O.
- Los análisis estadísticos con un valor p <0.001 demostraron que los pacientes de grupo O tienen más probabilidad de tener déficits cuantitativos del FvW en relación con los pacientes de grupo sanguíneo No-O.
- La mayoría de los pacientes participantes tiene una variante cuantitativa de la enfermedad de von Willebrand, por sus valores disminuidos del FvW: Ag, FVIII y FvW: CoR.
- En pacientes con enfermedad de von Willebrand se mantiene un alta correlación entre FvW y FVIII, que fue demostrada con el coeficiente de correlación de Spearman que obtuvo un valor p <0.001 y valor r 0.574.

5.4. RECOMENDACIONES

- Debería considerarse la tipificación sanguínea ABO en los pacientes con enfermedad de von Willebrand.
- El Ministerio de Salud Pública debería crear un nuevo algoritmo diagnóstico para coagulopatías e incluir en sus guías clínicas una relacionada con la enfermedad de von Willebrand.
- El Ministerio de Salud Pública debe implementar pruebas que permitan ofrecer un diagnóstico confirmatorio de la enfermedad de von Willebrand y clasificarla de acuerdo a sus tipos que facilite el seguimiento de los pacientes y la mejora de su calidad de vida.

5.5. BIBLIOGRAFÍA

AABB. (2012). *Manual Técnico de la Asociación Americana de Bancos de Sangre.* Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunohematología.

Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2014). *Inmunología básic: funciones y trastornos del sistema inmunitario.* Elsevier Health Sciences.

ADAM. Inc. (2019). *Biblioteca nacional de medicina de EEUU: Enciclopedia médica*. Obtenido de https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/002049.htm

Akin, M., Balkan, C., Yilmaz, D., & Kavakli, K. (2012). The influence of the ABO Blood type on the distribution of von Willebrand Factor in healthy children with no bleeding symptoms. *Clinical and Apllied Thrombosis/Hemostasis, 18*(3), 316-319.

Alharbi, A., Hassan, S., Al-Momen, A., & Al-Saleh, K. (2018). Influence of ABO blood group on von Willebrand factor tests in healthy Saudi blood donors. *Blood Coagul Fibrinolysis. 2018*, 29(2):211-215.

Álvarez, T. (2012). *Parámetros diagnósticos de la hemofilia y de la enfermadad von Willebrand. Hospital Universitario La Paz.* Obtenido de https://www.sefh.es/sefhjornadas/11_1.Alvarez_Roman.pdf

BD Vacutainer. (2019). *Acerca de los tubos vacutainer*. Obtenido de http://legacy.bd.com/scripts/mexico/vacutainer/productsdrilldown.asp?CatID=466&SubID=1875&siteID=20317&d=&s=mexico%2Fvacutainer&sTitle=Mexico+Vacutainer&metaTitle=Acerca+de+los+Tubos+BD+Vacutainer%C2%AE&dc=mexico%2Fvacutainer&dcTitle=Mexico+Vacutainer

Betancourt, V. &. (2012). *Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos.* Finlay.

Carmona, L. (2018). *UNAM: Control de calidad en el laboratorio clínico.* Obtenido de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Control_Calidad_22753.pdf

Carvajal, C. (2017). El endotelio: estructura, función y disfunción. *Medicina legal de Costa Rica, 34*(2).

Casari, C., Lenting, P., Wohner, N., Christophe, O., & Denis, C. (2013). Clearance of von Willebrand factor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.*, 11(Suppl. 1): 202–211.

CDC. (2019). *Facts about von Willebrand Disease*. Obtenido de https://www.cdc.gov/ncbddd/vwd/facts.html

Centro Nacional de información de ciencias médicas. (2018). *Infomed: Hematología* . Obtenido de http://articulos.sld.cu/hematologia/

CEPECAP. (2015). *Hematología y banco de sangre: grupos sanguíneos*. Obtenido de https://es.slideshare.net/cepecaptrujillo/2-sistema-abo-52875039

Choi, Q., Kim, J., & Kim, S. (2014). Influence of ABO type on global coagulation assay results: effect of coagulation factor VIII. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 53(9), pp. 1425-1432. doi:10.1515/cclm-2014-0909.

Condori, P. (2011). Reacción antígeno anticuerpo. *Revista de actualización clínica, 13*.

Cortés, A., & Muñiz, E. (2014). *Inmunohematología básica y aplicada.* Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional.

DiaSys. (2015). *Pruebas inmunoturbidimétricas.* Obtenido de https://www.diasys-diagnostics.com/fileadmin/promo-toolbox/Flyers_in_Spanish/820123_Flyer_Immunoturbidimetria_Span/ESP_Broschuere_Immunoturbidimetry_A4_151021.pdf?_=1445440651

Favaloro, E. (2014). Diagnosing von Willebrand Disease: a short story of laboratory milestones and innovations, plus current status, challenges and solutions. *Seminars in thrombosis & hemostasis, 40*(5), 551-570.

Favaloro, E., & Lippi, G. (2017). Preanalytical issues that may cause misdiagnosis in haemophilia and von Willebrand disease. *Haemophilia-Wiley&sons*, 1-13. DOI: 10.1111/hae.13396.

Federación Mundial de Hemofilia. (2010). Manual de Laboratorio. *Diagnóstico de la hemofilia y otros transtornos de la coagulación*, 11-28.

Federación Mundial Hemofilia. (2012). *Trastornos de la coagulación: la hemofilia*. Obtenido de https://www.wfh.org/es/page.aspx?pid=932

Franchini, M., Coppola, A., Mengoli, C., Rivolta, G., & Riccardi, F. (2017). Blood Group O Protects against Inhibitor Development in Severe Hemophilia A Patients. *Semin Thromb Hemost.*, 43(1):69-74.

Franchini, M., Crestani, S., Frattini, F., Sissa, C., & Bonfanti, C. (2014). ABO blood group and von Willebrand factor:biological implications. *Clin Chem Lab Med*, 52(9): 1273–1276. Doi: 10.1515/cclm-2014-0564.

Ganoa, J. (2014). *Principales causas de morbilidad ambulatoria-Ministerio de Salud Pública*. Obtenido de https://public.tableau.com/profile/javier.gaona#!/vizhome/morbi_rdacaa_2014/General

Hernández, E., Zavala, C., Quintana, S., & Reyes, E. (2015). Enfermedad de von Willebrand: biología molecular y diagnóstico. *Rev. Cirugía y cirujanos., 83*(3), 255-264. doi.org/10.1016/j.circir.2015.05.010.

INEC. (2010). *Población y demografía: Censo de población y vivienda*. Obtenido de https://www.ecuadorencifras.gob.ec/censo-de-poblacion-y-vivienda/

INEC. (2016). *Estadísticas de recursos y actividades de Salud*. Obtenido de https://www.ecuadorencifras.gob.ec/actividades-y-recursos-de-salud/

Instituto Naciona del Cáncer. (2017). *Electroforesis*. Obtenido de https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/electroforesis

Instituto Nacional del Cáncer. (2017). *Diccionario del NIH: plasma*. Obtenido de https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/buscar?contains=false&q=plasma

Instituto Nacional del Cáncer. (2017). *Diccionario NIH: Plaqueta*. Obtenido de https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/plaqueta

Instituto Nacional del Cáncer. (2019). *Diccionario de cáncer: metaloproteasa*. Obtenido de https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/metaloproteinasa-de-matriz

kaushansky, K., & Levi, M. (2018). *Williams Hematology Hemotasis and Thormbosis.* MacGraw-Hill Medical.

Kuter, D. (2018). *Manual MSD: introducción a la trombocitopenia*. Obtenido de https://www.msdmanuals.com/es-ec/hogar/trastornos-de-la-sangre/trastornos-de-las-plaquetas/introducci%C3%B3n-a-la-trombocitopenia

Liu, X., Chen, X., Yang, J., & Guo, R. (2017). Association of ABO blood groups with von Willebrand factor, factor VIII and ADAMTS-13 in patients with lung cancer. *Oncology Letters, 4*(3), 3787-3794. doi: 10.3892/ol.2017.6619.

Liumbruno, G., & Franchini, M. (2013). Beyond immunohematology: the role of the ABO blood group in human diseases. *Blood Transfusion*, 11: 491-9 DOI 10.2450/2013.0152-13.

Lumitos AG. (2017). *Química: Proteólisis*. Obtenido de http://www.quimica.es/enciclopedia/Prote%C3%B3lisis.html

Márquez, Y., Lancheros, A., & Díaz, E. (2019). Grupos sanguíneos y su relación con los niveles plasmáticos del Factor de von Willebrand. *Universidad y Salud, 21*(3), 277-287. doi:http://dx.doi.org/10.22267/rus.192103.165

Meschengieser, S. (2015). Enfoque diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand y hemofilia adquirida en nuestro país. *Revista Hematología, 19*, 25-31.

Mihalez, C. (2015). *Inmunología: Aglutinación*. Obtenido de https://es.slideshare.net/cmihalez/aglutinacin-46907567

MSP & Ministerio del Ambiente. (2014). *Reglamento Interministerial de gestión de desechos sanitarios.* Obtenido de https://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2016/12/ACUERDO_MINISTERIAL_5186_REGLAMENTO_INTERMINISTERIAL_GESTI%C3%93N_DESECHOS_SANITARIOS.pdf

MSP. (2019). *Guías de practica clínica*. Obtenido de https://www.salud.gob.ec/guias-de-practica-clinica/

National Human Genome Research Institute . (2019). *About Genomics: Glossary of genetic terms*. Obtenido de https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Gen

OMS. (2015). *Manual de bioseguridad en el Laboratorio*. Obtenido de https://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf

Ortiz, K. (2016). *Prevalencia del antígeno D del factor Rh, como marcador de genes de ascendencia indígena mediante la técnica de aglutinación en gel en donantes Quito, en el laboratoria de génetica e inmunología de la facultad de ciencias médicas de la UCE.* Universidad Central del Ecuador.

Obtenido de http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/7899/1/T-UCE-0006-046.pdf

Parra, K. (2014). *Frecuencia de subgrupos del antígeno A en donantes voluntarios que acuden al Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana, al Norte de Quito-Ecuador, 2013.* Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Real Academia de Ingeniería. (2019). *Diccionario de términos*. Obtenido de http://diccionario.raing.es/es/lema/turbidimetr%C3%ADa

Rodak, B., Fritsma, G., & Keohane, E. (2014). *Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas* (4ta ed.). Ed. Médica Panamericana.

SIEMENS . (2017). Determinación de vWF Ag.

SIEMENS. (2012). Reactivo BC de von Willebrand para determinación de la actividad del cofactor ristocetina.

SIMED. (2017). Coagulometro CA-660.

Thermo Scientific. (2016). *Human vWF ELISA Kit Manual*. Obtenido de https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/EHVWF.pdf

Tp Laboratorio Químico. (2017). *Centrífuga de laboratorio*. Obtenido de https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/centrifuga-de-laboratorio.html

Ulloa, A. (2013). *Análisis Retrospectivo de la frecuencia y tipo de anticuerpos irregulares en donantes voluntarios de sangre en el Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana, Quito 2009-2012.* Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Obtenido de http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/5684/T-PUCE-5834.pdf;sequence=1

United Nations. (2017). *Department of Economic and Social Affairs: Revision of World Population Prospects.* Obtenido de https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2017_DataBooklet.pdf

Universidad de Cantabria. (2017). *Hemostasia: plaquetas*. Obtenido de https://ocw.unican.es/mod/page/view.php?id=548

Vidal, L., & Vargas, C. (2014). Medición de Absorbancia óptica de soluciones acuosas mediante la instrumentación virtual. *Sciencia et Technica*, 49-53. doi: ISSN 0122-1701

Woods, A., Blanco, A., Kempfer, A., Paiva, J., & Bermejo, E. (2016). Factor de von Willebrand y enfermedad de von Willebrand: nuevos enfoques diagnósticos. *Acta bioquímica clínica Latinoamericana, 50*(2).

Zavelia, M., & Jaloma, A. (2015). Algoritmo diagnóstico para la enfermedad de von Willebrand (EvW) en población mexicana. *Gaceta Médica de México*, 399-402.

5.6 ANEXOS

Anexo A: Formulario de consentimiento informado

PARTE I: Consentimiento informado para adultos participantes

Título de la investigación: "Frecuencia de los grupos sanguíneos ABO y su relación con la actividad del factor de von Willebrand en pacientes diagnosticados con la enfermedad provenientes de ocho provincias del Ecuador en el año 2019"

Introducción: Mi nombre es Josselyn Proaño Meneses, y quiero contarle de que trata este estudio. Cómo es de su conocimiento usted ya ha sido diagnosticado con la enfermedad de von Willebrand y mi propósito es apoyar con más estudios para que su médico conozca y sea de ayuda en su tratamiento. Se va a identificar qué tipo de sangre usted tiene, que puede ser clasificado como grupo sanguíneo O, A, B o AB. El motivo de investigar su grupo sanguíneo es para identificar si está relacionado con la cantidad y función del factor de von Willebrand que es la sustancia que le ayuda a controlar sangrados cuando usted se lastima o sufre un golpe fuerte, también realizaré otra prueba de coagulación para saber cómo está funcionando el factor de von Willebrand en sangre y qué tan efectivo es para detener un sangrado. Le pido su autorización para acceder a los datos que proporcionó en la encuesta realizada para el proyecto previo 'Diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand en ocho provincias del Ecuador y su relación con los trastornos hemorrágicos en el periodo 2018-2019. Con estos resultados y los datos del proyecto anterior se apoyará al médico y a usted para un mejor seguimiento de su enfermedad.

Propósito: el propósito o fin de este estudio es observar si su tipo de sangre se relaciona con la cantidad en sangre del Factor de von Willebrand y así ayudarle a usted para que se realice un mejor seguimiento y manejo de su enfermedad.

Procedimientos y protocolo: después de que usted acepte participar se hará un pinchazo en su brazo para extraer dos tubos de sangre (muestras) que tiene más o menos unas cuatro cucharadas de sangre, se realizarán las pruebas para conocer su tipo de sangre esto se determina al mezclar su sangre con unos reactivos y se visualizará si alrededor de los glóbulos rojos de su sangre existen sustancias llamadas antígenos y que son las que le dan la característica de pertenecer a cualquier grupo sanguíneo. También se le realizará la prueba para medir la cantidad y actividad del factor de von Willebrand para conocer si tiene algo que ver con su tipo de sangre.

Manejo de muestras y resultados: Las muestras serán llevadas a la PUCE donde se realizarán las pruebas, luego de la verificación de resultados serán eliminadas. Los resultados disposición de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y se almacenarán por un lapso de 7años, protegidos y custodiados por el director del estudio. Serán utilizadas únicamente para este estudio y su propósito.

Selección de participantes: para participar en este estudio se han seleccionado solo personas con enfermedad de von Willebrand para determinar qué grupo sanguíneo presenta y si está relacionado con la cantidad del factor que usted posee.

Participación voluntaria: Su participación en la investigación es totalmente voluntaria, usted puede elegir participar o no. Puede negarse a participar y no será afectado de ninguna forma, no existirá ninguna sanción ni perderá beneficios en el servicio de salud al que asiste.

Duración del estudio: la investigación durará un total de ocho meses, pasado este tiempo recibirá el resultado de su tipo de sangre y los valores del Factor vW.
Riesgos: durante la toma de muestra puede que sea necesario otro pinchazo por no obtener la cantidad adecuada de sangre, esto se realiza en pocos casos porque existen venas que no se ven muy bien o son profundas y hacen difícil llegar a ellas para sacar la sangre, pero se tratará de que usted no sienta molestias durante o después del pinchazo.
Beneficios: Usted podrá conocer su tipo de sangre, se le entregará una tarjeta con nombre y grupo sanguíneo. En caso de encontrar relación entre el tipo de sangre y la cantidad y/o función del factor de von Willebrand podría recibir información adicional para manejo de su enfermedad.
Confidencialidad: Toda información que usted entregue para este estudio será mantenida confidencialmente, será usada solo para la investigación y no se ligará con su nombre.
Los datos analizados en el trabajo de titulación estarán a disposición de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y se almacenarán por un lapso de 7años, protegidos y custodiados por el director del estudio.
Derecho a negarse o retirarse: Puede decidir no participar. O puede cambiar de idea y dejar de participar aun cuando ya haya aceptado antes, en este caso ya no se utilizará su muestra para el proyecto y se procederá a su eliminación. Usted no va a perder su derecho a la atención médica que recibe actualmente o requiera recibir.
A quién contactar: en caso de que usted tenga alguna pregunta o inquietud al respecto del estudio, se puede contactar con las siguientes personas encargadas de la investigación: Josselyn Proaño Meneses: 0998377105 (jproano259@puce.edu.ec); Mst. Rosa de Fátima Chiriboga Ponce: 0969011129 (rchiriboga@puce.edu.ec).
Esta propuesta ha sido revisada y aprobada por el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la PUCE cuya tarea es asegurarse de que se proteja de daños a los participantes en la investigación. Si usted desea averiguar más sobre este comité, contáctese con el secretario del Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la PUCE: Dr. Hugo Navarrete. Av 12 de octubre 1076 y Ramón Roca, Quito. Edificio Administrativo, piso 3, oficina 327. Teléfono: 2991700 – Ext. 2917.

PARTE II: Formulario de Consentimiento
He sido invitado a participar en la investigación de: “Frecuencia de los grupos sanguíneos ABO y su relación con la actividad del factor de von Willebrand en pacientes diagnosticados con la enfermedad provenientes de ocho provincias del Ecuador en el año 2019”. Entiendo de qué se trata esta investigación y comprendo que las muestras de sangre serán usadas únicamente para estudio. Me han informado de los posibles riesgos o molestias. Me han dado el nombre de un investigador y su número telefónico para poder contactarlo. Estoy de acuerdo en que los resultados de la investigación estén a disposición de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
“He leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado las preguntas que he realizado. Acepto voluntariamente participar en esta investigación como participante y

entiendo que tengo derecho a retirarme de la investigación en cualquier momento sin que me afecte en ninguna manera mis derechos"

Nombre del participante_____

Firma de participante: _____

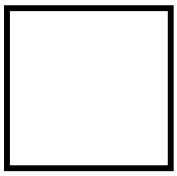
Fecha (día/mes/año): _____

Si es analfabeto

He sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento para el posible participante, ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmo que el individuo ha dado consentimiento voluntariamente.

Nombre del testigo_____

Huella dactilar del participante



Firma del testigo: _____

Fecha (día/mes/año): _____

He leído con exactitud o he sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento informado para el posible participante, ha tenido oportunidad de hacer preguntas. Confirmo que el individuo ha dado consentimiento libremente.

Nombre del investigador (quien toma el consentimiento) _____

Firma del investigador: _____

Fecha (día/mes/año): _____

Anexo B: Consentimiento informado para padres o representantes de participantes menores de edad

Título de la investigación: **"**Frecuencia de los grupos sanguíneos ABO y su relación con la actividad del factor de von Willebrand en pacientes diagnosticados con la enfermedad provenientes de ocho provincias del Ecuador en el año 2019"
Introducción: Mi nombre es Josselyn Proaño Meneses y quiero contarle de que trata este estudio. Cómo sabe su hijo/a o representado ha sido diagnosticado con la enfermedad de von Willebrand y quiero apoyar con más estudios para que su médico conozca y sea de ayuda en el tratamiento. Se va a identificar qué tipo de sangre tiene su hijo o representado. Puede ser O, A, B o AB, la razón de determinar el tipo de sangre es para averiguar si está relacionado con la cantidad de factor de von Willebrand.
Objetivo: Determinar el grupo sanguíneo ABO de pacientes con enfermedad de von Willebrand y relacionar el grupo con la cantidad y actividad del factor de von Willebrand, así, si existe alguna relación se podrá ayudar al manejo y seguimiento de los pacientes.
Procedimiento: a su hijo(a) o representado(a) se le realizará un pinchazo en el brazo para sacar dos tubos de sangre que tienen aproximadamente 4ml (dos cucharadas). Se harán pruebas para determinar el grupo sanguíneo. También se le realizará una prueba para medir la cantidad y actividad del factor de von Willebrand para ver si están relacionados. Luego de confirmar los resultados las muestras serán eliminadas.
Manejo de muestras y resultados: Las muestras serán llevadas a la PUCE donde se realizarán las pruebas, luego de la verificación de resultados serán eliminadas. Los resultados disposición de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y se almacenarán por un lapso de 7años, protegidos y custodiados por el director del estudio. Serán utilizadas únicamente para este estudio y su propósito.
Duración del estudio: la investigación durará un total de ocho meses, pasado este tiempo recibirá el resultado de su tipo de sangre y los valores del Factor vW.
Participación voluntaria: la participación de su hijo(a) o representado(a) en la investigación es totalmente voluntaria, puede elegir participar o no.
Confidencialidad: los resultados de este estudio serán mantenidos confidencialmente, serán usados solo para esta la investigación.
Beneficios: su hijo(a) o representado(a) podrá conocer su tipo de sangre, se le entregará una tarjeta con nombre y grupo sanguíneo. En caso de encontrar relación entre el tipo de sangre y la cantidad y/o función del factor de von Willebrand podría recibir información adicional para manejo de su enfermedad.
Riesgos o molestias: durante la toma de muestra puede que sea necesario otro pinchazo por no obtener la cantidad adecuada de sangre, esto se realiza en pocos casos porque existen venas que no se ven muy bien o son profundas y hacen difícil llegar a ellas para sacar la sangre, pero se tratará de que su hijo(a) o representado(a) no sienta molestias durante o después del pinchazo.
Costos e incentivos: su hijo(a) o representado(a) no recibirá ningún incentivo financiero o regalo por su participación
Derecho a negarse o retirarse: Puede negarse a que su hijo(a) o representado(a) participe o retirarlo aun después de haber aceptado. Puede retirar a su hijo(a) o representado(a) en cualquier momento y no será afectado de ninguna forma, no existirá ninguna consecuencia o sanción. Si decide retirar a su

hijo después de haber tomado la muestra, ya no usará para la investigación y se eliminará.

Mayor información: en caso de que usted tenga alguna pregunta o inquietud al respecto del estudio, se puede contactar con las siguientes personas encargadas de la investigación: Josselyn Proaño Meneses: 0998377105 (jproano259@puce.edu.ec); Mst. Rosa de Fátima Chiriboga Ponce: 0969011129 (rchiroboga@puce.edu.ec), o con el Dr. HugoSecretario del Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la PUCE: Dr. Hugo Guillermo Navarrete Zambrano-secretario del Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Av. 12 de octubre 1076 y Ramón Roca, Quito. Edificio Administrativo, piso 3, oficina 327. Teléfono: 2991700 – Ext. 2917.

PARTE II: Firma de Consentimiento informado para padres o representantes

Yo, _____, padre o representante legal del niño(a)_____declaro que he leído la información proporcionada o me ha sido leída y he entendido completamente en qué consistirá la participación de mi hijo(a) o representado(a) en la investigación "Frecuencia de los grupos sanguíneos ABO y su relación con la actividad del factor de von Willebrand en pacientes diagnosticados con enfermedad provenientes de ocho provincias del Ecuador en el año 2019".

Me explicaron que a mi hijo(a) o representado(a) le sacarán unas muestras de sangre pinchándole el brazo. Sé que la investigación durará 8 meses. Me informaron de los riesgos o molestias que podría tener mi hijo(a) o representado(a) al momento de tomar la muestra. Entiendo que las muestras serán llevadas a la PUCE para hacer las pruebas, después serán eliminadas.

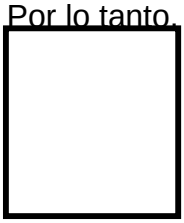
Me informaron que una vez acabada la investigación mi hijo(a) o representado(a) recibirá una tarjeta con su nombre y grupo sanguíneo e información sobre el manejo de su enfermedad si es necesario.

Comprendo que la participación es voluntaria, que mi hijo(a) o representado(a) no recibirá ningún tipo de compensación o regalo por participar. Sé que puedo retirar a mi hijo(a) o representado(a) en cualquier momento si lo creo necesario y que no habrá ninguna consecuencia o sanción.

Entiendo que los resultados de esta investigación serán confidenciales y solo serán usados para la investigación.

Además, he tenido la oportunidad de hacer preguntas que han sido contestadas.

Por lo tanto, estoy de acuerdo en que mi hijo(a) o representado(a) participe.



Firma del representante o padre de familia _____

Nombre del representante o padre de familia_____

Firma del investigador: _____

Nombre del investigador:_____

Fecha (día/mes/año): _____

Anexo C: Asentimiento informado para participantes menores de edad

PARTE I: Asentimiento informado para participantes menores de edad >6 años.

Título de la investigación: **"**Frecuencia de los grupos sanguíneos ABO y su relación con la actividad del factor de von Willebrand en pacientes diagnosticados con la enfermedad provenientes de ocho provincias del Ecuador en el año 2019"

Hola, mi nombre es Josselyn Proaño, estudiante de la Pontificia Universidad del Ecuador en Quito. Actualmente estoy realizando un estudio para conocer acerca del tipo de sangre que tienes.

Tu participación en el estudio consistirá en que, cuando aceptes participar y conozcas que tienes la enfermedad de Von Willebrand se te pedirá que me permitas tomarte una muestra pequeña de sangre pinchando con una aguja en el pliegue de tu antebrazo y recogiendo la sangre en un solo tubo pequeño de plástico que lleva 1 ml de sangre (media cucharadita), con todo el cuidado que requiere el pinchazo y sin hacerte daño. Con esa muestra vamos a conocer qué tipo de sangre tienes y su relación con la cantidad de la sustancia que ayuda a que no sangres, estos resultados le diremos a tu doctor quien te contará a ti y a tus papitos que significa.

Tu participación en el estudio es voluntaria, es decir, aunque tu papá o mamá hayan dicho que puedes participar, si tú no quieres hacerlo puedes decir que no. Es tu decisión si participas o no en el estudio. Si en algún momento ya no quieres continuar en el estudio, no habrá ningún problema.

Toda la información que nos proporciones y tu muestra de sangre nos ayudarán a saber que grupo de sangre tienes y esa información te servirá desde ahora hasta cuando seas un adulto. Esta información será confidencial. Esto quiere decir que no diremos a nadie el resultado del estudio, sólo lo sabrán las personas que forman parte del equipo de este estudio y tus papás cuando ya les demos el resultado de tu grupo sanguíneo.

Si aceptas participar, por favor pon una **(✓)** en el cuadrito de abajo que dice "Sí quiero participar" y escribe tu nombre.

Si no quieres participar, no pongas ninguna **(✓)**, ni escribas tu nombre.

☐ Sí quiero participar

Nombre: _____

Nombre y firma del investigador:

_____

_____

Fecha:

Anexo D: Carta de aprobación del CEISH-PUCE

Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos

PUCE

Quito, 11 de marzo de 2019
Oficio-CEISH-684-2019

Señorita estudiante
Josselyn Alejandra Proaño Meneses
Carrera de Bioquímica Clínica de la Facultad de Medicina de la PUCE
Presente.

Estimada Sta. Proaño:

El Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la PUCE, en la sesión del 28.02.2019, estudió el proyecto: **Frecuencia de los grupos sanguíneos ABO y su relación con la actividad del factor de von Willebrand (FvW) en pacientes diagnosticados con la enfermedad provenientes de ocho provincias del Ecuador en el año 2019.** Código 2018-21-MB.

Este proyecto fue aprobado inicialmente por el Comité en la sesión del 22.11.2018, oficio CEISH-635-2018.

El Ministerio de Salud Pública solicitó que el CEISH-PUCE aprobara la corrección de ciertos cambios realizados en el estudio, por esta razón, el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la PUCE **APRUEBA DEFINITIVAMENTE** el proyecto en la sesión del 28.02.2019, por el tiempo estimado de duración que es de 8 meses.

Igualmente, con el fin de dar seguimiento, se solicita:

- Presentar la carta de aprobación de la Dirección Nacional de Inteligencia de la Salud.
- Comunicar por escrito al CEISH-PUCE el momento del inicio de la investigación.
- Entregar informe parcial y final cuando sea solicitado por el CEISH-PUCE.

Con nuestra consideración y estima,

Dra. Laura Arcos Terán
Presidente

Mtr. Yan Arévalo Rico
Secretario

Pontificia Universidad Católica del Ecuador
COMITÉ DE ETICA DE LA INVESTIGACION EN SERES HUMANOS

LAT/yar

Av. 12 de octubre 1076 y Ramón Roca
Apartado postal 17-01-2184
Telf.: (593) 2 299 17 00 ext. 2917

Anexo E: Aprobación del Ministerio de Salud Pública

Coordinación General de Desarrollo Estratégico en Salud
Dirección Nacional de Inteligencia de la Salud

Oficio Nro. MSP-DIS-2019-0190-O

Quito, D.M., 30 de abril de 2019

Asunto: Respuesta a la solicitud del estudio MSPCURI000291-3: "Frecuencia de los grupos sanguíneos ABO y su relación con la actividad del factor de von Willebrand (FvW) en pacientes diagnosticados con la enfermedad provenientes de ocho provincias del Ec..."

Señorita
Josselyn Alejandra Proaño Meneses
En su Despacho

De mi consideración:

En respuesta al oficio Nro. MSP-DIS-2019-3492-E ingresado al Ministerio de Salud Pública, en el que la investigadora Josselyn Proaño Meneses, estudiante de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, remite el protocolo del estudio observacional denominado: ***"Frecuencia de los grupos sanguíneos ABO y su relación con la actividad del factor de von Willebrand (FvW) en pacientes diagnosticados con la enfermedad provenientes de ocho provincias del Ecuador en año 2019"***, codificado por la Dirección Nacional de Inteligencia de la Salud (DIS) como MSPCURI000291-3, cumpliendo los requisitos mínimos para la evaluación del mismo y contando con el criterio favorable del Programa Nacional de Sangre, se **APRUEBA** la versión adjunta del protocolo.

Le recordamos que una vez finalizada la investigación, es responsabilidad de la investigadora principal enviar a esta Dirección y al Programa Nacional de Sangre los resultados de la misma, así como, las publicaciones que se realicen como producto de este estudio.

La Dirección Nacional de Inteligencia de la Salud, aprueba los protocolos de los estudios observacionales en el ámbito de sus competencias, en base a una revisión de la calidad metodológica y ética de los estudios. Sin embargo, el contenido, la autoría y la responsabilidad sobre los resultados del estudio corresponden al Patrocinador y a la Investigadora Principal, exonerando al Ministerio de Salud Pública de cualquier acción legal que se derive por esta causa.

El presente estudio se desarrollará en la Fundación Hemofílica Ecuatoriana FUNDHEC. Es importante recalcar que de acuerdo a lo indicado en el protocolo de investigación aprobado, los rubros serán asumidos por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Cabe mencionar que si bien los resultados podrían contribuir a la salud pública, éstos no son de carácter vinculante para esta Cartera de Estado.

Me despido con sentimientos de distinguida consideración y estima.

Oficio Nro. MSP-DIS-2019-0190-O

Quito, D.M., 30 de abril de 2019

Atentamente,

Documento firmado electrónicamente

Mgs. Adriana Elizabeth Granizo Martínez.
DIRECTORA NACIONAL DE INTELIGENCIA DE LA SALUD

Referencias:
- MSP-DNGA-SG-10-2019-3492-E

Anexos:
- mspcuri000291-3.pdf

Copia:
Señorita Licenciada
Luisa Cecilia Varela Calderón
Coordinadora del Programa Nacional de Sangre

Doctora
Laura Arcos Terán
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DEL ECUADOR-PUCE

Señora Magister
Miriam del Rocio Obando Rodriguez
Analista de la Dirección Nacional de Inteligencia

Señor Ingeniero
Mauricio Estuardo Villarroel Utreras
Especialista de Evaluación de Tecnología Sanitaria 1

Señorita
Tatiana Gulnara Beltran Loyo
Asistente Administrativa 3

Señorita Técnica
Laura Mercedes Torres Heredia
Asistente Administrativa 3

gs

ADRIANA ELIZABETH GRANIZO MARTINEZ

Anexo F: Instrumentos, Metodologías y pruebas estándar

Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación

Manual de Laboratorio (Federación Mundial de Hemofilia, 2010)

Obtención de muestras y variables preanalíticas: Los procedimientos para la obtención y procesamiento de muestras de sangre para análisis de hemostasia están descritos en detalle en una serie de directrices (CLSI 2007, 2008a, 2008b). De ser posible, se extrae sangre venosa del pliegue del codo con la ayuda de un torniquete. El torniquete debe aplicarse justo antes de la extracción. La aguja no debe tener un calibre superior a 21 para adultos y la muestra debe tomarse con una jeringa y/o con un sistema de extracción al vacío que permita la rápida extracción de la muestra de sangre. La sangre debe ingresar lentamente en la jeringa. Para los bebés, se puede usar una aguja de calibre 22 o 23. Toda muestra que no se obtenga de manera rápida mediante una punción venosa que resulte satisfactoria de inmediato deberá desecharse para evitar la posible activación de la coagulación. La sangre no debe volver a pasar por la aguja después de haber ingresado en la jeringa. La aguja debe retirarse antes de pasar la sangre de la jeringa al recipiente con anticoagulante. Tras la extracción, se debe mezclar con el anticoagulante. Una vez que se mezclan, se deberá sellar el recipiente y mezclar el contenido mediante cinco inversiones suaves. Evitar agitar el recipiente enérgicamente. Algunos autores recomiendan no utilizar los primeros 5 ml de sangre extraída para los análisis de hemostasia. Si el sistema utilizado para la extracción es por vacío, debe tenerse en cuenta que la mezcla por cinco inversiones suaves también es necesaria después de que la sangre ha entrado en contacto con el anticoagulante. La sangre se mezclarse con el anticoagulante citrato de sodio en una proporción de 9 partes de sangre por 1 parte de anticoagulante. Esto resultará en una concentración de 0,109M (citrato trisódico dihidratado al 3,2%) o similar (por ejemplo, en algunos sistemas al vacío se utiliza de forma satisfactoria el anticoagulante citrato con una concentración de 0,105 M). La solución anticoagulante puede ser almacenada a 4 ºC hasta un máximo de tres meses. Antes de su uso, deberá ser inspeccionada y desechada si se encuentra material particulado en ella, lo que sucede, por ejemplo, cuando se contamina. El recipiente de la muestra no debe provocar activación por contacto (es decir, se deberán utilizar recipientes de plástico o cristal siliconizado).

Anexo G: Prueba de tipificación sanguínea

Método: Tipificación ABO de los glóbulos rojos en tubo

Principios

El procedimiento siguiente es un método representativo aceptable, pero es necesario consultar las instrucciones del fabricante de los reactivos.

Muestras

Para determinar los requerimientos específicos de las muestras, es preciso consultar las especificaciones pertinentes. En general, se emplean muestras de sangre anticoaguladas. Los glóbulos rojos pueden suspenderse en suero autólogo, plasma o solución salina, también se pueden lavar y luego ser re suspendidos en solución salina.

Reactivos

1. Anti-A
2. Anti-B
3. Anti-A,B (opcional)

Todos los reactivos deben utilizarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Procedimiento

Tipificación de los glóbulos rojos

1. Colocar 1 gota de anti-A en un tubo de ensayo limpio y rotulado.
2. Colocar 1 gota de anti-B en un tubo de ensayo limpio y rotulado.
3. Clocar 1 gota de anti-A, B en un tubo de ensayo limpio y rotulado, si corresponde.
4. Agregar 1 gota de una suspensión al 2-5% (en solución salina, suero o plasma) de los glóbulos rojos en estudio, a cada tubo. también es posible transferir la cantidad equivalente de glóbulos rojos con varillas limpias.
5. Mezclar el contenido de los tubos con suavidad y centrifugar de acuerdo con las instrucciones, casi siempre 15-30 segundos a 900-1 000 x g.
6. Resuspender con suavidad las células y examinar en busca de aglutinación.
7. Leer, interpretar y registrar los resultados.

Interpretación

1. La aglutinación de los glóbulos rojos en estudio, constituye un resultado positivo.
2. La suspensión uniforme después de la resuspensión de las células, constituye un resultado negativo. (AABB, 2012)

Anexo H: Inserto de la cuantificación del factor de von Willebrand

Reactivo vWF Ag

Reactivos para la determinación inmunoturbidimétrica del antígeno del factor von Willebrand (vWF Ag)

Campo de aplicación

El kit de ensayo vWF Ag se utiliza en el diagnóstico in vitro, junto con los analizadores de coagulación Siemens Healthcare Diagnostics o SYSMEX para la determinación cuantitativa del
vWF Ag en plasmas humanos mediante inmunoturbidimetría.

Significado diagnóstico

El factor von Willebrand (vWF) es una glicoproteína, secretada en el plasma por las células endoteliales y por los megacariocitos. Su función en la adhesión y agregación de plaquetas sanguíneas, el vWF juega un papel importante tanto en la hemostasia primaria, en la formación del tapón hemostático, como también en el proceso de coagulación mediante la estabilización del factor VIII.

Una deficiencia cualitativa y/o cuantitativa del vWF ocasiona el síndrome de von Willebrand
(vWS), que es una de las alteraciones hereditarias de la coagulación sanguínea más frecuente.

Principio del método

Mediante la mezcla de las muestras que contienen el antígeno de von Willebrand, con el reactivo se van a aglomerar las pequeñas partículas de poliestireno recubiertas con anticuerpo. Los anticuerpos específicos se van a unir con las partículas mediante uniones covalentes. Finalmente se va a medir esta aglutinación por turbidimetria, determinando el aumento de la turbidez. La turbidez se comporta de forma directamente proporcional al nivel de antígeno en la muestra.

Composición de reactivos:

Reactivo látex: suspensión de pequeñas partículas de poliestireno, las cuales están recubiertas con anticuerpos de conejo. Conservante: azida sódica (< 1 g/L)

Diluyente para el reactivo látex: solución que contiene glicina, se utiliza para la dilución del reactivo látex. Conservante: azida sódica (< 1 g/L)

Tampón: Tampón de glicina Conservante: azida sódica (< 1 g/L)

Muestra:

Para separar el plasma, mezclar 1 parte de solución de citrato sódico (0,11 mol/L, 3,2 %) con 9 partes de sangre venosa, evitando formar espuma. Centrifugue inmediatamente durante al menos 15 minutos a 1500 x g a temperatura ambiente (15 a 25 °C) y retire el plasma sobrenadante. Consérvelo entre 15 a 25 °C hasta empezar la prueba, pero nunca más de 8 horas. Las muestras de plasma almacenadas a temperaturas entre 2 a 8 °C pueden mantenerse hasta 24 horas. En estado de ultra congelación (–20 a −30 °C) la estabilidad es de 1 mes. El plasma ultra congelado debe descongelarse a 37 °C por lo menos durante 15 minutos antes de empezar la prueba y mezclarse.

Utilizar los plasmas de los pacientes sin diluir. Las diluciones con el Dade® Tampón veronal Owren van a ser realizadas automáticamente por los analizadores de coagulación de Siemens o SYSMEX.

Control de calidad interno

Intervalo normal: Plasma Control N

Intervalo patológico: Plasma Control P

Si es necesario utilizar un control en el intervalo de medición bajo, el Plasma control P reconstituido puede diluirse a 1:4 con el tampón específico del sistema. En ese caso, el valor esperado será equivalente a ¼ del valor indicado para el Plasma control P en la Tabla de valores asignados específica del lote. Los controles son necesarios para garantizar la exactitud y la reproducibilidad de los resultados. Se deben medir dos niveles del material de control de calidad (intervalo normal e intervalo patológico) al iniciar un ciclo de pruebas, con cada calibración, al cambiar el frasco de reactivo y en cada turno de trabajo (SIEMENS , 2017).

Anexo I: Inserto de la actividad del cofactor Ristocetina

Reactivo BC de von Willebrand

Para determinación de la actividad del cofactor ristocetina

Uso previsto

Reactivo para uso *in vitro* para determinar la actividad del cofactor ristocetina del factor de von Willebrand, en plasma humano mediante la aglutinación de plaquetas.

Resumen y explicación

El presente reactivo se usa para la determinación del cofactor ristocetina para apoyar el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand y de enfermedades con cambios del cofactor ristocetina como por ejemplo lesiones del endotelio vascular e inflamaciones entre otros.

Principio del método

El factor de von Willebrand contenido en la muestra del paciente, en presencia de ristocetina ocasiona la aglutinación de plaquetas estabilizadas existentes en el reactivo BC de von Willebrand. La aglutinación resultante disminuye la turbidez de la mezcla de reacción. Un aparato de medida de la coagulación mide la variación de la densidad óptica y va a determinar automáticamente la actividad del cofactor ristocetina en la muestra, en % del valor normal.

Composición de los reactivos

El reactivo BC de von Willebrand contiene plaquetas estabilizadas, ristocetina y EDTA en forma liofilizada. Agente conservante: azida de sodio (≤0,5 g/L).

El ensayo puede utilizarse con métodos manuales o en analizadores de coagulación automáticos.

Muestra

Toma de muestra y preparación previa al ensayo

Para obtener el plasma mezclar cuidadosamente 1 parte de solución de citrato de sodio (0,11mol/L) con 9 partes de sangre venosa, evitando la formación de espuma. Centrifugar inmediatamente la muestra de sangre a 1 500 x g, no menos de 15 minutos y a temperatura ambiente, retirar el sobrenadante y guardarlo entre 15 a 25^{O}C hasta que se necesite en la prueba (máximo 6 horas) o congelar para su almacenamiento a ≤ -20 ^{O}C hasta 1 mes.

Procedimiento

En el sistema BCT se debe añadir al frasco de reactivo un agitador magnético y colocarlo en una de las posiciones para reactivos. En el caso de que el coagulómetro no tenga agitador, asegurese de resuspender el reactivo mezclándolo cada 30 minutos como mínimo. Para cada cambio de aparato y para cada nuevo lote de reactivo BC de von Willebrand se debe realizar una nueva curva de referencia.

Control de calidad interno

Rango normal: Plasma control N

Rango patológico: Plasma control P

Con cada envase de reactivo, para cada calibración y por lo menos cada 8 horas en un día de la trabajo, se deben medir también dos controles (uno normal y uno en el rango patológico). El control se debe tratar como las muestras. Las mediciones se deben realizar por duplicado. Los resultados obtenidos deben estar comprendidos dentro del intervalo indicado para los controles en la tabla de valores asignados específica del lote. Si un valor de control medido se encuentra fuera del intervalo determinado permitido, se deberá revisar el coagulómetro, el reactivo, y la curva de referencia. No validar los resultados del paciente hasta haber identificado y corregido la causa de la desviación (SIEMENS, 2012).

Anexo J: Inserto para determinación de factor VIII

Plasma deficiente en factor VIII de la coagulación

Campo de aplicación

Reactivo de diagnóstico in vitro para determinación de la actividad de los factores de coagulación VIII.

Significado diagnóstico

La determinación de los factores de coagulación VIII en plasma está indicada para:

Para clarificar la causa de un tiempo de tromboplastina parcial activada prolongado

Para el diagnóstico de estados de deficiencia del factor

Para diferenciación entre disproteinemias y trastornos en la síntesis de proteínas

También se utiliza para el seguimiento de la terapia de sustitución con concentrados del factor.

Principio del método

Un plasma con deficiencia del factor dará lugar un tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) prolongado. Se puede utilizar el plasma deficiente en factor de coagulación para confirmar el déficit del factor en general y para identificar, cuantificar un déficit de factor en el plasma del paciente. Se analiza una mezcla del plasma deficiente en el factor correspondiente y del plasma del paciente con el ensayo APTT y el resultado se interpreta usando una curva de referencia obtenida a partir de diluciones de plasma humano estándar o de un pool de plasmas normal mezclando con plasma deficiente. Un plasma de un paciente con déficit de factor no será capaz de compensar la ausencia del factor en el plasma deficiente y dará resultado de APTT prolongado.

Composición de los reactivos

Plasma deficiente de factor VIII de la coagulación: Los plasmas deficientes son plasmas humanos, liofilizados, con una actividad residual de los factores VIII ≤ 1%. Son preparados por inmunoadsorción de plasmas normales y están libres de antígenos del factor VIII. El contenido de fibrinógeno se encuentra sobre 1g/L y la actividad de los otros factores de la coagulación está sobre el 40% de normalidad. Los plasmas contienen manitol como estabilizador.

Flujo de trabajo

Diluya la muestra de plasma en una proporción de 1:5 en solución tampón imidazol inmediatamente antes de la medición.

Pipetee lo siguiente en un tubo de ensayo precalentado a 37 ^{O}C:

Plasma deficiente	100 µL
Muestra diluida	100 µL
Reactivo APTT	100 µL
Incube a 37 ^{O}C	2 minutos
Solución de cloruro de calcio (precalentado a 37 ^{O}C)	100 µL
Al añadir la solución de cloruro de calcio, ponga en marcha el cronómetro o el temporizador del coagulómetro y determine el tiempo de coagulación.	

Cálculo de los resultados del análisis

El contenido de factor de coagulación se obtiene leyendo en la curva de referencia en % de normalidad. Si el valor nominal dado para el plasma humano estándar no corresponde al 100 % de normalidad, si no por ej., al 95 %, el resultado leído se debe multiplicar por 0,95. Para tiempos de coagulación, los cuales correspondan a un contenido de factor de más del 100 % de normalidad, se necesitan otras determinaciones con diluciones mayores de las muestras (por ej., 1:10). En la valoración de estas muestras, el valor en % leído en la curva de referencia para esta dilución, se debe multiplicar por un factor de corrección, por ej., para una dilución de 1:10 por el factor de corrección 2.

Anexo K: Especificaciones del coagulómetro

MARCA	SIEMENS
MODELO	SERIE CA-660
DESCRIPCIÓN	Coagulómetro
PROCEDENCIA	Alemania

CARACTERISTICAS	BENEFICIOS
Instrumento totalmente automatizado.	Tiempo mínimo en el procesamiento de las muestras.
Cargador automático de muestras.	Menos manipulación del operador. Rapidez en el procesamiento de las pruebas.
Realización de técnicas coagulométricas (sistema óptico) y cromogénicas e inmunológicas (Dimero D).	Mayor menú de pruebas en el mismo equipo.
Capacidad de realización de pruebas STAT.	Capacidad de procesamiento de pruebas de emergencia sin afectar la lista de trabajo programada.
Posee 6 espacios para incubación de muestras, 4 fotoceldas de lectura, 1 canal cromogénico.	Se pueden realizar pruebas cromogénicas.
Procesa 60 test por hora.	Rapidez en la entrega de resultados.
Realiza autorepeticiones y auto diluciones.	Optimización del trabajo del operador.
Pantalla touch screen.	Facilidad en el manejo del equipo.
Diseñado para trabajar con L.I.S. (Sistema de información laboratorial).	Equipo bi-direccional para automatización total del laboratorio.
El primer resultado se procesa en	Rapidez en el reporte de resultados.

un tiempo máximo de 7 - 9 minutos	
Lector de código de barras.	Elimina el ingreso de información en el equipo.
Trabaja con tubo primario y/o copas.	Versatilidad para el operador.
Carga continua de reactivos.	Mayor rapidez.
Deshecho automático de cubetas.	Bioseguridad.
Refrigeración de reactivos dentro del equipo.	Evita el deterioro de reactivos por cambios frecuentes de temperatura.
Homogenización de reactivos a bordo.	Automatización total.
Impresión de resultados en papel térmico o impresora externa.	Facilidad de reporte de acuerdo a las necesidades.
Reporte de fibrinógeno derivado.	Dato adicional que puede ser de utilidad para el médico tratante.
Corriente de 110 voltios.	Adecuado a las condiciones generales de corriente en nuestro país.

(SIMED, 2017)

Anexo L: Informe general post-estudio

Se realizará un informe general dirigido al Director de *FUNDHEC*, una vez terminado el estudio donde se detallan los resultados obtenidos y los aspectos más relevantes sobre el mismo.

<table>
<tr><td>Título del proyecto de titulación:</td><td colspan="3">“Frecuencia de los grupos sanguíneos ABO y su relación con la actividad del factor de von Willebrand en pacientes diagnosticados con la enfermedad provenientes de ocho provincias del Ecuador en el año 2019”</td></tr>
<tr><td>Investigador principal (tesista):</td><td>Josselyn Proaño Meneses</td><td>Director del proyecto de titulación:</td><td>Mtr. Rosa De Fátima Chiriboga Ponce</td></tr>
<tr><td colspan="4">Resultados personales (de cada paciente)</td></tr>
<tr><td>Código ID</td><td>Fenotipo ABO</td><td colspan="2">Pruebas de coagulación</td><td>Pruebas de actividad</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td>FvW</td><td>FVIII</td><td>CoRistocetina</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="4">Resultados globales</td></tr>
<tr><td colspan="4">Resultados estadísticos</td></tr>
<tr><td colspan="4">Conclusiones</td></tr>
<tr><td colspan="4">Recomendaciones</td></tr>
</table>

Anexo M: Certificado de cursos de capacitación en enfermedad de von Willebrand

Golden® Importadora

doble

RRPGOLDEN INTEGRA IMPORTADORA S.A.

Otorga el presente certificado a:

Joselyn Proaño

Por haber participado en la charla:

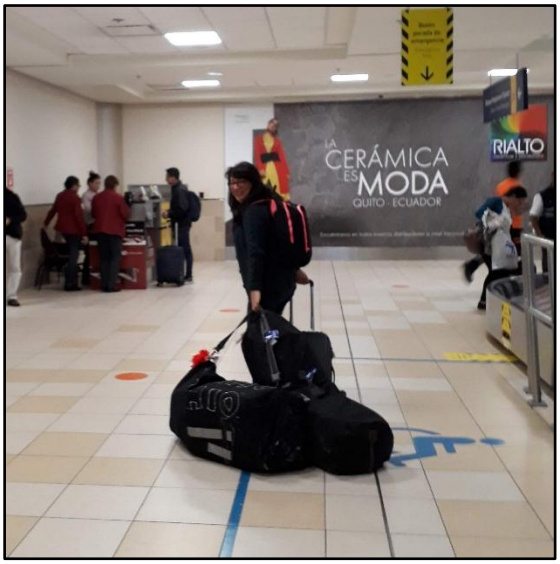
"DIAGNÓSTICO EN LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND", impartida por la Dra. Gloria Ramos (Colombia) en el Hotel Quito el día 28 de Septiembre del 2018.

RUTH GUERRERO
GERENTE GENERAL

DR. GONZALO RIVADENEIRA N.
DIRECCIÓN MÉDICA

Anexo N: Proceso del estudio (fotos)

Toma de muestras





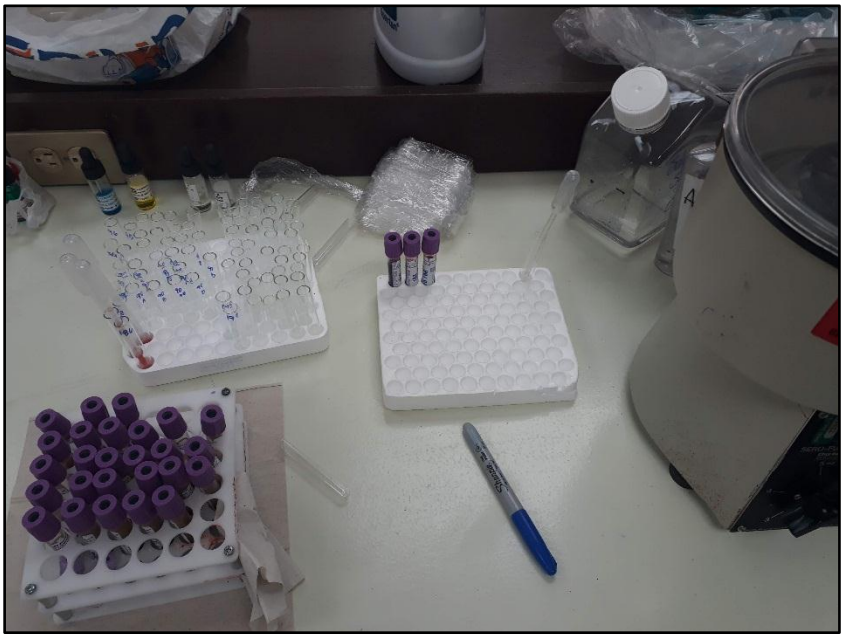








Tipificación sanguínea



Procesamiento de FvW, FVIII y cofactor ristocetina



