

Consideraciones acerca del VWF:CB utilizando diferentes tipos de colágeno, para el estudio de la enfermedad de von Willebrand.

Adriana I Woods. MSc
Dra Ana C Kempfer

Laboratorio de Hemostasia y Trombosis, IMEX-CONICET-Academia Nacional de Medicina; Instituto de Investigaciones Hematológicas, ANM, Buenos Aires, Argentina.
Comité de von Willebrand, grupo CLAHT.

El factor von Willebrand (VWF) juega su rol en el mantenimiento de la integridad vascular uniéndose al colágeno del subendotelio y ayudando a reclutar plaquetas en el sitio de injuria. Su alteración define una entidad clínica hemorrágica conocida como enfermedad de von Willebrand (VWD) (1), en sus variantes cualitativas (tipo 2) como cuantitativas (tipo 1 y 3).

Las pruebas fenotípicas necesarias para definir la VWD y sus variantes son: el factor VIII (FVIII); el antígeno de VWF (VWF:Ag), que se mide por inmunoensayos cuantitativos, disponible en la mayoría de los laboratorios; el cofactor de ristocetina (VWF:RCo) que evalúa la capacidad del VWF de unirse a su receptor plaquetario, la GP1b, a través de su habilidad de aglutinar plaquetas en presencia de ristocetina; el enlace al colágeno (VWF:CB) que mide la capacidad de unirse al colágeno, que se evalúa por ELISA; el propéptido (VWFpp) (ELISA), que evalúa la cantidad real de VWF sintetizado y liberado al plasma; la agregación plaquetaria inducida por ristocetina (RIPA) y el patrón multimérico, que analiza la presencia o ausencia de los multímeros de diferente peso molecular del VWF.

La guía de VWD publicada por el NHILBI (2) sugiere realizar el VWF:CB sólo a aquellos pacientes con normal VWF:Ag y VWF:RCo, mientras que otros autores proponen su uso como suplemento del VWF:RCo (3). Sin embargo, hay que tener en cuenta que ambos ensayos evalúan la actividad del VWF a través de diferentes mecanismos, ya mencionados; por lo tanto, hasta el presente, a pesar de las limitaciones del método (alto coeficiente de variación), el VWF:RCo sigue siendo un ensayo muy valioso en la búsqueda del diagnóstico de VWD o para diferenciar entre los tipo 1 y tipo 2, es ampliamente usado, y aceptado como gold standard para medir actividad del VWF.

Respecto del VWF:CB, se conocen dos sitios de unión del VWF al colágeno, localizados en los dominios A1 y A3 (4); este último parece ser fisiológicamente el más importante (5), aunque el sitio de unión del dominio A1 también puede, bajo condiciones de flujo, sustituir con eficiencia el sitio de unión del dominio A3 (6). En la práctica, no todos los laboratorios incluyen el VWF:CB en la batería de pruebas para el diagnóstico de VWD. El ensayo, puede usarse para distinguir ciertas sub-variantes de VWD tipo 2 (7). Se consideran valores normales el cociente $VWF:CB/VWF:Ag > 0,6-0,7$ (3, 8), aunque otros (9) considera el corte a una razón de 0,5.

Dentro de las variantes cualitativas, el tipo 2M se debe a la presencia de mutaciones ubicadas en el dominio A1 que no afectan la normal multimerización, pero que alteran la interacción VWF-GP1b de las plaquetas. Esta variante se caracteriza por disminución del cociente $VWF:RCo/VWF:Ag (< 0,6)$ pero normal el cociente $VWF:CB/VWF:Ag$, especialmente después de infusión de DDAVP (8).

El ensayo original (11) usaba colágeno tipo I bovino. Estudios posteriores usaron colágeno humano tipo I o tipo III, y la combinación de ambos parece proveer mayor sensibilidad para detectar los VWD tipo 2 (3, 12). No hay acuerdo en cuanto a la concentración de colágeno adecuada, y esto parece depender del tipo de colágeno que se utilice: Flood et al (13) utiliza colágenos de placenta humana tipo III a 1 ug/mL (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) y tipo I a una concentración de 5 ug/mL (Sigma, St Louis, MO, USA). Riddell et al (14) utiliza colágeno de placenta humana, tipo III a 2,7 ug/mL, ó tipo I a 10 ug/mL. Existen además otras condiciones técnicas que pueden influir en el ensayo: trabajos recientes sugieren que la máxima unión de colágeno tipo I-y III a la superficie se consigue con buffer salino fosfato en lugar de buffer carbonato (15), y es máximo entre 8-16 horas.

Se han descrito mutaciones en el dominio A3 que resultan en VWF:CB disminuido, utilizando colágenos tipo I y III (14, 16-18), siendo estos, casos de defectos aislados de VWF:CB, y los pacientes se incluyen en el subgrupo de VWD 2M (19). La prevalencia de estas mutaciones no es clara dado que muchos de estos pacientes con síntomas hemorrágicos y VWF:Ag y VWF:RCo normales no son diagnosticados inicialmente al no ser detectados por los ensayos habituales; de esta forma se perderían si no se realiza el VWF:CB en ellos (18). Un trabajo recientemente publicado (20), refiere una sensibilidad para detectar anomalías de los multímeros del 99% en pacientes tipo 1 y del 100% en pacientes tipo 2A y 2B, usando un cociente VWF:CB/VWF:Ag de 0,6.

El colágeno tipo VI se co-localiza en el subendotelio vascular con el VWF (21). Esto parece ocurrir en el subendotelio superficial, provocando la adhesión temprana de las plaquetas, dependiente del VWF, bajo condiciones de bajo shear (22). El VWF se une al colágeno tipo VI a través del dominio A1 (21), y a los tipos I y III a través de los dominios A3 y A1 (4). Para el ELISA VWF:CB utilizando colágeno tipo VI, los autores (13) utilizaron un equipo comercial (Thechnoclone GmbH, Austria).

Defectos en la unión al colágeno tipo VI, pero no al colágeno tipo I y III, se observaron en sujetos con BS anormal, dos casos con VWF:Ag y VWF:RCo normales y otro caso con VWD tipo 1 (23) en quienes se encontró la R1399H en heterocigocidad. Otras dos mutaciones en el dominio A1, S1387I y Q1402P y una delección de 11 aminoácidos (del 1392-1402) también se asocian a pérdida de la unión al colágeno tipo VI, aunque no en todos los pacientes. Los mismos tenían multímeros normales, lo que sostiene la idea de un defecto específico en la unión al colágeno tipo VI, además de sugerir que el dominio A1 probablemente represente al sitio de unión para el colágeno tipo VI. La interpretación de estos resultados es limitada dado que la mayoría de los pacientes tenían también bajos niveles de VWF:Ag.

En conclusión, como técnica complementaria a las ya descritas, para la correcta interpretación de los resultados del VWF:CB y su correlación con el fenotipo de los pacientes, hay que tener en cuenta el colágeno utilizado; para estudiar el sitio de unión al colágeno del dominio A3, y en consecuencia su integridad, se necesitaría utilizar el colágeno tipo I/III, mientras que si queremos estudiar el dominio A1, necesitaríamos utilizar colágeno tipo VI. Vemos entonces cómo se complejiza cada vez más el estudio de la VWD, aumentando el requerimiento de técnicas más complejas, con el objeto de no descartar el diagnóstico de VWD en pacientes con anomalías en el VWF que de otro modo no se detectarían.

Bibliografía:

1. Third Åland islands conference on von Willebrand disease, 26-28 September 2012: meeting report. Berntorp E, Fuchs B, Makris M, Montgomery R, Flood V, O'Donnell JS, Federici AB, Lillicrap D, James P, Budde U, Morfini M, Petrini P, Austin S, Kannicht C, Jiménez-Yuste V, Lee C. *Haemophilia*. 2013;19 Suppl 3:1-18.
2. Nichols WL, Hultin MB, James AH, Manco-Johnson MJ, Montgomery RR, Ortel TL, Rick ME, Sadler JE, Weinstein M, Yawn BP. von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia* 2008; 14: 171-232.
3. Favaloro EJ. An update on the von Willebrand factor collagen binding assay: 21 years of age and beyond adolescence but not yet a mature adult. *Sem Thromb Haemost* 2007; 33: 727-44.
4. Pareti FI, Niiya K, McPherson JM, Ruggeri ZM. Isolation and characterization of two domains of human von Willebrand factor that interact with fibrillar collagen types I and III. *J Biol Chem* 1987; 262: 13835-41.

5. Cruz MA, Yuan H, Lee JR, Wise RJ, Handin RI. Interaction of the von Willebrand factor (vWF) with collagen. Localization of the primary collagen-binding site by analysis of recombinant vWF A domain polypeptides. *J Biol Chem* 1995; 270: 10822-7.
6. Bonnefoy A, Romijn RA, Vandervoort PA, VAN Rompaey I, Vermynen J, Hoylaerts MF. von Willebrand factor A1 domain can adequately substitute for A3 domain in recruitment of flowing platelets to collagen. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2151-61.
7. Budde U, Pieconka A, Will K, Schneppenheim R. Laboratory testing for von Willebrand disease: contribution of multimer analysis to diagnosis and classification. *Semin Thromb Hemost* 2006;32:514-21.
8. Federici AB, Canciani MT, Forza I, Cozzi G. Ristocetin cofactor and collagen binding activities normalized to antigen levels for a rapid diagnosis of type 2 von Willebrand disease-single center comparison of four different assays. *Thromb Haemost* 2000; 84: 1127-8.
9. Ni Y, Nesrallah J, Agnew M, Geske FJ, Favaloro EJ. Establishment and characterization of a new and stable collagen-binding assay for the assessment of von Willebrand factor activity. *Int J Lab Hematol* 2013; 35: 170-6.
15. Mendelboum Raviv S, Szekeres-Csiki K, Jenei A, Nagy J, Shenkman B, Savion N, Harsfalvi J. Coating conditions matter to collagen matrix formation regarding von Willebrand factor and platelet binding. *Thromb Res* 2012; 129: e29-35.
10. Gadisseur A, van der Planken M, Schroyens W, Berneman Z, Michiels JJ. Dominant von Willebrand disease type 2M and 2U are variable expressions of one distinct disease entity caused by loss-of-function mutations in the A1 domain of the von Willebrand factor gene. *Acta Haematol* 2009; 121: 145-53.
11. Brown JE, Bosak JO. An ELISA test for the binding of von Willebrand antigen to collagen. *Thromb Res* 1986; 43: 303-11.
12. Favaloro EJ. Collagen binding assay for von Willebrand factor (VWF:CBA): detection of von Willebrand's Disease (VWD), and discrimination of VWD subtypes, depends on collagen source. *Thromb Haemost* 2000; 83: 127-35.
13. Flood VH, Gill JC, Christopherson PA, Wren JS, Friedman KD, Haberichter SL, Hoffmann RG, Montgomery RR. Comparison of type I, type III and type VI collagen binding assays in diagnosis of von Willebrand disease. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 1425-32.
14. Riddell AF, Gomez K, Millar CM, Mellars G, Gill S, Brown SA, Sutherland M, Laffan MA, McKinnon TA. Characterization of W1745C and S1783A: 2 novel mutations causing defective collagen binding in the A3 domain of von Willebrand factor. *Blood* 2009; 114: 3489-96.
16. Ribba AS, Loisel I, Lavergne JM, Juhan-Vague I, Obert B, Cherel G, Meyer D, Girma JP. Ser968Thr mutation within the A3 domain of von Willebrand factor (VWF) in two related patients leads to a defective binding of VWF to collagen. *Thromb Haemost* 2001; 86: 848-54.
17. Flood VH, Lederman CA, Wren JS, Christopherson PA, Friedman KD, Hoffmann RG, Montgomery RR. Absent collagen binding in a VWF A3 domain mutant: utility of the VWF:CB in diagnosis of VWD. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 1431-3.

18. Keeling D, Beavis J, Marr R, Sukhu K, Bignell P. A family with type 2M VWD with normal VWF:RCO but reduced VWF:CB and a M1761K mutation in the A3 domain. *Haemophilia* 2012; 18: e33.
19. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC, Favaloro EJ, Hill FG, Holmberg L, Ingerslev J, Lee CA, Lillicrap D, Mannucci PM, Mazurier C, Meyer D, Nichols WL, Nishino M, Peake IR, Rodeghiero F, Schneppenheim R, Ruggeri ZM, Srivastava A, Montgomery RR, Federici AB; Working Party on von Willebrand Disease Classification. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2103-14. Review.
20. Flood VH, Gill JC, Friedman KD, Christopherson PA, Jacobi PM, Hoffmann RG, Montgomery RR, Haberichter SL; the Zimmerman Program Investigators. Collagen Binding Provides a Sensitive Screen for Variant von Willebrand Disease. *Clin Chem* 2013 Jan 22. [Epub ahead of print]
21. Hoylaerts MF, Yamamoto H, Nuyts K, Vreys I, Deckmyn H, Vermynen J. Von Willebrand factor binds to native collagen VI primarily via its A1 domain. *Biochem J* 1997; 324: 185-91.
22. Ross JM, McIntire LV, Moake JL, Rand JH. Platelet adhesion and aggregation on human type VI collagen surfaces under physiological flow conditions. *Blood* 1995; 85: 1826-35.
23. Flood VH, Gill JC, Christopherson PA, Bellissimo DB, Friedman KD, Haberichter SL, Lentz SR, Montgomery RR. Critical von Willebrand factor A1 domain residues influence type VI collagen binding. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 1417-24.