

Patología molecular del factor Von Willebrand

Javier Batlle Fonrodona

Jefe del Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Juan Canalejo-Teresa Herrera. La Coruña. España.

Profesor Asociado de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela.

1. Introducción Histórica

En el año 1926 Erik von Willebrand describió por primera vez la existencia de un desorden hemorrágico hereditario en una amplia familia del archipiélago Aland (Golfo de Botnia, Finlandia) en la que, a diferencia de la hemofilia clásica, se encontraban afectados miembros de ambos sexos. La presencia de unos rasgos clínicos peculiares tales como manifestaciones hemorrágicas de tipo mucoso en lugar de las características hemorragias articulares, así como posteriormente la demostración de un tiempo de hemorragia prolongado hizo que esta nueva entidad recibiera la denominación de hemofilia vascular o pseudohemofilia. Finalmente recibiría el nombre de su descubridor el cual se ha mantenido hasta nuestros días, (FvW).

Desde entonces se fueron describiendo nuevos pacientes y se pudo apreciar la existencia de un defecto de una proteína de la coagulación, el factor VIII, en esta enfermedad, al igual que sucede en la hemofilia. Fue en 1971 cuando Zimmerman *et al.* establecieron la primera base molecular diferencial de esta enfermedad. Así obtuvieron un antisuero frente al denominado por entonces factor VIII que era capaz de precipitar un material presente tanto en sujetos normales como en pacientes con hemofilia, pero que estaba disminuido o ausente en los

pacientes con enfermedad de von Willebrand (EvW). Este material precipitable recibió el nombre de antígeno relacionado con el factor VIII, lo que ocasionó una confusión que perduró hasta prácticamente 1985 en la que claramente se aceptó universalmente el que este antígeno correspondía al de la proteína del factor von Willebrand, distinta a la del factor VIII.

Otro hallazgo realizado con este antisuero fue la observación en algunos pacientes con EvW de la existencia de una molécula con movilidad electroforética más anódica que la observada en los sujetos normales, diferenciándose así el tipo I con movilidad normal y el tipo II con movilidad alterada. Posteriormente fue acuñándose el tipo III para aquellos en los que prácticamente no existía este antígeno en su plasma (forma severa).

La primera caracterización funcional "in vitro" de la proteína del FvW fue consecuencia de dos hechos casi paralelos. Un antibiótico empleado en clínica humana fue retirado a consecuencia de su asociación con trombocitopenias importantes. En 1972, en el laboratorio de Howard y Firkin y al caer accidentalmente ristocetina de un frasco a un tubo con plasma rico en plaquetas (PRP) preparado para estudio de agregación plaquetar se observó que dicho plasma formaba unos acúmulos plaquetares que sedimentaban. Investigando este fenómeno se comprobó adicionalmente que ello no ocurría cuando se añadía ristocetina a PRP de pacientes con EvW. El seguimiento de estas observaciones condujo a la concepción de la actividad de esta proteína como cofactor de la ristocetina (también por entonces atribuída al factor VIII; hoy en día denominada FvW:RCo). Este parámetro fue utilizado en el diagnóstico de la EvW y aun hoy en día sigue constituyendo uno de los más discriminativos de dicha enfermedad.

La ristocetina permitió a Ruggeri et al. describir una forma especial de EvW siendo la particularidad de su plasma de aglutinar plaquetas del propio paciente o normales en presencia de concentraciones muy bajas de este antibiótico, las cuales no tengan efecto ni en sujetos normales ni en otros pacientes con EvW. Se designó a estos pacientes como tipo IIB para diferenciarlos de los que no tengan esta propiedad (IIA.)

Tras estos períodos de cierta confusión, fue en 1985 cuando se aceptó universalmente que el factor VIII inicial era un complejo de dos proteínas diferentes, la del factor VIII (FVIII) y la del factor von Willebrand (FvW). El FVIII depende de un gen ubicado en el cromosoma X y se produce en el hepatocito y

célula sinusoidal hepática, aun cuando su gen manifiesta una pequeña expresión en otros tipos celulares (linfocitos, etc). El factor VIII es liberado al plasma y circulará formando un complejo con el FvW que actúa como transportador y protector de la primera frente a la degradación proteolítica prematura. Así será transportada hasta el lugar en el que se activa la hemostasia participando como cofactor en la vía intrínseca de la coagulación. Un hecho conceptual importante es que en la EvW la patología del FVIII es siempre secundaria a la del FvW y no primaria (como sucede en la hemofilia clásica).

El FvW depende de un gen ubicado en el cromosoma 12 y se sintetiza en el endotelio y megacariocito. De ahí irá a formar parte de tres compartimentos muy diferentes: el plasmático, el plaquetar (en sus gránulos alfa), y el subendotelial (pared vascular). Su papel en el plasma es el de actuar no sólo como una simple proteína adhesiva (especie de pegamento) anclando las plaquetas a la zona de pared vascular dañada, sino que también va a participar actuando como un verdadero agente agonista inductor de la función plaquetar. Todo ello contribuye a la formación de un tapón hemostático eficiente.

2. Gen, síntesis y procesamiento del factor von Willebrand

En la actualidad se sabe que el gen del FvW se halla en el brazo corto del cromosoma 12 existiendo un seudogén parcial no funcional en el cromosoma 22. Tras el logro de la secuenciación de prácticamente todo el seudogén se ha observado la existencia de una analogía con el auténtico gen de un 97%, lo que parece indicar un origen evolutivo muy reciente. La presencia de múltiples “stop codons” en la secuencia codificadora del seudogén parece demostrar claramente que no es funcional. La localización y la alta coincidencia en la secuencia entre ambos plantea problemas difíciles a la hora de la identificación de las mutaciones subyacentes en la EvW. El gen verdadero abarca 178 kilobases (kb), se halla interrumpido por aproximadamente 51 intrones y consta de más de 50 exones. El RNA mensajero (RNAm) del FvW tiene una longitud de 8,7 kb y codifica 2.813 aminoácidos. Este RNAm se traduce en un primer monómero, el proFvW, el cual contiene un propeptido de aproximadamente unos 100 kDa denominado antígeno II del FvW (AgIIFvW), que se rompe durante la polimerización, dando lugar a un monómero maduro, glicosilado de 2.050 aminoácidos.

El referido gen codifica, en las células endoteliales y megacariocitos la producción del monómero proFvW. Los monómeros proFvW se unen entre sí a través de puentes disulfuro en las zonas carboxiterminales para formar dímeros, al tiempo que atraviesan el retículo endoplásmico y aparato de Golgi. Los dímeros proFvW son empaquetados en los cuerpos de Weibel Palade de las células endoteliales o en los gránulos alfa de los megacariocitos. A continuación se retiran de las zonas aminoterminal de ambos monómeros las porciones propolipeptídicas de 100 kDa. Los dímeros maduros, cada uno de 275 kDa, se unen a través de puentes disulfuro para formar multímeros de distinto tamaño. Cuando se analiza el FvW plaquetar o endotelial puede observarse cómo presenta multímeros de mayor tamaño que los presentes en plasma en circunstancias basales; también pueden verse en el plasma fetal y neonatal.

El cDNA del FvW) fue aislado por primera vez en 1985 por cuatro grupos independientes. Titani determinó la secuencia de la subunidad madura del FvW utilizando la técnica directa de secuenciación de aminoácidos. Sorprendentemente el FvW cDNA origina un producto de traducción primaria de unos 309 kDa (2.813 aminoácidos) que se corresponde con la secuencia de la parte aminoterminal del FvW maduro comenzando en el codón 764. También se pudo comprobar cómo el segmento aminoterminal codifica un péptido señal hidrofóbico típico seguido de una secuencia idéntica a la del Antígeno II del FvW (FvW AgII). Este último antígeno es una proteína plasmática, de función desconocida inicialmente, y que se ha podido ver que desarrolla un papel importante en el proceso de multimerización del FvW encauzando a éste hacia los cuerpos de Weibel Palade. Así tras la separación del propéptido FvW AgII, el FvW maduro queda constituido como una glicoproteína compuesta por monómeros de 275 kilodaltons (kDa) y 2.050 aminoácidos.

2.1. Estructura multimérica del FvW.

El desarrollo y refinamiento de la metodología electroforética permitió conocer con más detalle la estructura íntima de la molécula del factor von Willebrand en condiciones normales y en la EvW. Así, la utilización de los geles de agarosa en presencia de dodecilo sulfato sódico y sistema discontinuo de tampones comprobó que el FvW aparece constituido por una serie lineal de multímeros cuyo peso molecular puede alcanzar cifras superiores a los 14 millones

de daltons siendo así probablemente la proteína soluble de mayor tamaño presente en el plasma. En plasma normal existe una mayor proporción de los elementos de mayor tamaño, los cuales se consideran como los de mayor eficacia hemostática. En los lugares de síntesis y/o depósito (endotelio y plaquetas) existen elementos de mayor tamaño que los presentes en el plasma correspondiente en condiciones basales. Estos elementos pueden aparecer transitoriamente en el plasma tras ejercicio, estrés y tras la administración de un análogo de la vasopresina, el acetato de desmopresina (DDAVP). Precisamente por este efecto el DDAVP es uno de los agentes terapéuticos utilizados ampliamente en un gran número de pacientes con EvW.

Utilizando geles de mayor concentración (mayor capacidad resolutive) se ha podido apreciar como cada multímero se halla constituido de una banda central de mayor intensidad y al menos cuatro satélites. El interés de este hallazgo radica en que su estudio en la EvW ha permitido ir diferenciando distintos tipos moleculares según la proporción y movilidad de dichas bandas (formas IIA, IIB, IIC, IID, etc.).

2.2. Subunidad del FvW

El FvW interacciona con colágeno, heparina y dos receptores plaquetares específicos diferentes ubicados en las glicoproteínas Ib (GPIb) y complejo IIb/IIIa (GPIIb/IIIa). Para poder desarrollar estas funciones, el FvW posee en su molécula una serie de módulos o áreas funcionales concretos, presentes en cada monómero.

El FvW, al igual que otras proteínas adhesivas como la fibronectina y el fibrinógeno entre otras, presenta en su estructura la secuencia tetrapeptídica Arginina-Glicina-Asparagina-(Serina) (R-G-D-[S]) implicada en la adhesión celular. En su interior la subunidad del FvW presenta cuatro secuencias diferentes que se repiten un número variable de veces que también reciben el nombre de dominios (diferentes a los dominios funcionales mencionados).

Los hidratos de carbono presentes en su molécula constituyen un 18.7% de su peso. Es una molécula con varios lugares glicosilados. Estos componentes parecen ejercer un papel protector de la misma frente a la acción de los enzimas proteolíticos. De otro lado, el FvW desializado es capaz de interactuar con los receptores plaquetares dependientes de la GPIb incluso en ausencia de agen-

te inductor. Otro aspecto bioquímico relevante del FvW es la alta proporción en su composición de cisteína la cual está implicada en los puentes disulfuro intra o intercatenarios que contribuyen en gran manera a la estructura final de esta proteína. Morfológicamente la subunidad nativa del FvW muestra un aspecto de barra en su zona carboxiterminal y un aspecto nodular en su zona aminoterminal.

Un hecho de gran importancia lo constituye la existencia de un enlace peptídico en la estructura de este monómero maduro comprendido entre la tirosina 842 y metionina 843 que muestra una especial sensibilidad a la proteólisis dependiente de la proteasa calpaína, una proteasa natural celular neutra calcio-dependiente. La rotura de este péptido produce un fragmento en la zona carboxiterminal del monómero de unos 176 kDa, así como un fragmento de la zona aminoterminal de la subunidad madura de peso molecular aproximado de 140 kDa.

El FvW presente en la circulación normal está constituido por una subunidad de unos 225 kDa como lo demuestra su análisis tras purificación y reducción con agentes como el 2-Mercaptoetanol o Ditiotreitól. Sin embargo ya en condiciones basales se ha podido comprobar cómo esta subunidad está parcialmente fragmentada fundamentalmente en tres piezas de 189, 176 y 140 kDa, indicando que fisiológicamente enzimas proteolíticos o proteasas están actuando sobre la molécula del FvW. Nosotros hemos podido demostrar que tras la administración de DDAVP se modifica transitoriamente la proporción relativa de estos fragmentos de forma que disminuyen las bandas de 189 y 140 kDa y aumenta la de 176 kDa, lo que parece indicar que la infusión de DDAVP se acompaña de un mayor procesamiento proteolítico del FvW.

3. Enfermedad de von Willebrand congénita

Constituye el desorden hemorrágico hereditario más frecuente (entre el 1 y 3 % de la población) y es extremadamente heterogéneo. Su diagnóstico radica en un repertorio de pruebas de laboratorio, las cuales, unas veces individualmente y otras de forma combinada, demuestran la existencia de patología del factor von Willebrand. Estas pruebas son:

3.1. Valoración estructural y funcional del FvW.

3.1.a. El tiempo de hemorragia de Ivy.

- 3.1.b. La dosificación del antígeno del FvW (FvW:Ag) .
- 3.1.c. La actividad del FvW como cofactor de la ristocetina (FvW:RCo).
- 3.1.d. La aglutinación plaquetar inducida en presencia de diferentes concentraciones de ristocetina (RIPA).
- 3.1.e. El análisis multimérico del FvW en geles con poro de distinto tamaño (geles de bajo y alto poder de resolución).
- 3.1.f. Estudio de la subunidad del FvW.
- 3.1.g. Valoración de la capacidad de unión del FvW al FVIII.
- 3.1.h. Otros métodos de valoración tales como los sistemas de perfusión “ex-vivo” utilizando la cámara de perfusión de Baumgartner o de Sakariassen. Permiten entre otros aspectos conocer la capacidad de interacción de esta proteína con la pared vascular o incluso con componentes individualizados.

Así mismo es de gran información la determinación del FVIII, aun cuando las alteraciones de esta molécula en la enfermedad de von Willebrand son siempre secundarias a la anomalía del FvW, su proteína transportadora. Es importante tener en cuenta que los niveles del FvW varían con el tiempo, circunstancias acompañante (estrés, ejercicio, drogas, etc), incluso guardan cierta relación con el grupo ABO. Por ello el diagnóstico puede requerir varias extracciones para lograr tipificar a un paciente determinado.

3.2. Tipos y variantes de enfermedad de von Willebrand. EvW.

Se han descrito gran número de subtipos de esta enfermedad y se han propuesto diferentes formas de clasificación sin que todavía haya un acuerdo internacional pleno. Tradicionalmente se venían distinguiendo tres grandes grupos: el tipo I en el que están presentes todos los multímeros de FvW aunque la cantidad total del FvW está disminuida. El tipo II que incluye a todas las formas de esta enfermedad que presentan una deficiencia de los elementos de tamaño molecular intermedio y/o grande, y que constituía el grupo o tipo “variante de EvW”. El tipo III se reserva para los pacientes severos con ausencia prácticamente total del FvW. Gracias a los geles de alto poder de resolución se fueron distinguiendo múltiples subtipos dentro del tipo II como por ejemplo el subtipo

IIA, IIB, IIC, etc. En la forma IIB se apreció desde el principio una capacidad del FvW de aglutinar plaquetas en presencia de concentraciones bajas de ristocetina, dándole una especial propiedad a este subtipo. Sin embargo el descubrimiento de enfermos con esta última propiedad, pero que por otra parte presentaban una estructura multimérica completamente normal (EvW New York), hizo sugerir a algún autor que tal vez esta última variante y el subtipo IIB deberían separarse en grupo aparte: las formas con hipersusceptibilidad a la ristocetina. La reciente aparición de formas moleculares con estructura multimérica normal, y niveles normales de FvW pero con afectación selectiva del dominio del FvW para el FVIII complica estos hechos ya que estimula la creación de un grupo o tipo nuevo más dentro de la clasificación. Es por ello que mientras no haya un acuerdo en este sentido, y a la espera de que los estudios genéticos faciliten una mejor clasificación, parece razonable seguir las recomendaciones propuestas por Ruggeri y Zimmerman en el año 1987 distinguiendo tres grandes grupos con algunos subgrupos dentro de la EvW:

Tipo I: Trastorno exclusivamente cuantitativo del FvW. (FvW:Ag=FvW:RCo).

Tipo II: Trastorno cualitativo, esto es, anomalía funcional del FvW. A su vez puede asociarse a un trastorno cuantitativo. En él habría que distinguir varios subgrupos:

–Pacientes con respuesta reducida del FvW a la ristocetina. Con un FvW:Ag > FvW:RCo)

–Pacientes con respuesta aumentada (hipersusceptibilidad) del FvW a la ristocetina.

Además a nuestro entender en la actualidad habría que incluir un subgrupo más:

–Pacientes con trastorno del dominio del FvW para unión del FVIII.

Tipo III: Forma severa en la que el FvW se encuentra total o prácticamente ausente tanto en lo que respecta al FvW:Ag como al FvW:RCo.

3.2.a. Tipo I de EvW.

Es la forma más frecuente. El análisis multimérico en geles de alto poder de resolución revela la presencia de todos los multímeros, y la función de los multímeros es normal, sin embargo presenta una disminución del nivel de la proteína. Dentro de este subtipo se encuentran las formas:

3.2.a.1. EvW I-1, o con bajo FvW plaquetar: Con disminución del FvW tanto en plaqueta como en plasma.

3.2.a.2. EvW I-2, o plaquetar normal: En la que la alteración cuantitativa existe sólo en el plasma.

3.2.a.3. EvW I-3: A diferencia de la I-2 muestra una alteración cuantitativa sólo en plaquetas, no en el plasma.

3.2.a.4. Persistencia del Pro-FvW: Es consecuencia de la ausencia de separación de este antígeno de la subunidad del FvW. Obviamente la subunidad del FvW en estos pacientes tiene un peso molecular mayor de lo normal.

3.2.a.5. EvW Vicenza: Se caracteriza por presencia en condiciones basales de multímeros de mayor tamaño que los presentes en sujeto normal.

3.2.b. Tipo II de EvW.

Los niveles cuantitativos del FvW y del FVIII pueden variar notablemente de un enfermo a otro, siendo normal en unos y bajo en otros. También este tipo incluye múltiples subtipos que se diferencian entre sí por la estructura fina de cada multímero del FvW plasmático y/o plaquetar, así como por otras alteraciones funcionales. Incluye:

3.2.b.1. Tipo II con disminución de respuesta del FvW a la ristocetina:

EvW IIA. Es el más frecuente del tipo II. Se caracteriza por un incremento de la proporción relativa de las bandas satélites de cada multímero. Ello es más relevante cuando la muestra de plasma se recoge en ausencia de inhibidores de proteasas. Desde hace ya varios años se viene sospechando una susceptibilidad del FvW a la acción de enzimas proteolíticos en algunos pacientes IIA pero no en todos.

EvW IIC: Su forma de herencia es recesiva. Se caracteriza por un incremento en la proporción relativa del multímero más rápido (primer multímero) y la sustitución del patrón de bandas satélites por un patrón de una única banda o un doblete repetitivos. Los pacientes heterocigotos para el defecto IIC muestran un fenotipo multimérico que se caracteriza por el gran aumento del primer multímero y por una disminución de la proporción relativa de las bandas satélites de cada multímero. Asimismo su FvW consta de multímeros de todos los tama-

ños. Este fenotipo sugiere la existencia de dos productos diferentes: uno procedente del gen normal y otro del gen con el defecto IIC. De forma que la parte de FvW anormal sigue siendo variante ya que los multímeros de mayor tamaño corresponderían al FvW normal.

EvW IID: Tiene un patrón de bandeo mucho más complejo que en el sujeto normal.

EvW IIE: A diferencia de la anterior se caracteriza por una única banda repetitiva.

EvW IIF: Muestra un FvW plaquetar normal pero el plasmático carece de formas de alto peso molecular y tiene reducidas las de tamaño intermedio, mostrando así mismo un patrón de multímero muy parecido al observado en el FvW plaquetar. Tras la administración de DDAVP el patrón anormal resulta más aparente y además se visualizan bandas adicionales no identificadas claramente antes de su infusión.

EvW IIG: Carece de la banda más lenta de cada multímero así como un patrón de FvW plaquetar prácticamente normal.

EvW IIH: En lugar de triplete muestra una banda central más difusa con la banda satélite más rápida. Este patrón anormal no se modifica tras la infusión de DDAVP.

En lo que concierne al patrón de subunidad del FvW en condiciones basales, las formas IIA presentan, un mayor grado de fragmentación ya que muestran una mayor proporción relativa de las bandas de 176 y 140 kDa. Por el contrario en las formas IIC, IID y IIE se observa una mayor proporción relativa de la subunidad nativa, lo que indica un menor grado de fragmentación del FvW, o lo que es lo mismo una mayor resistencia a la acción proteolítica.

Debido a que las formas IIC, IID, IIE, IIF, IIG muestran algunos datos clínicos y de laboratorio similares a los presentes en la forma IIA, algunos investigadores plantean la posibilidad de que todas estas variantes puedan ser la consecuencia de una patología similar a la subyacente en la IIA que motiva diferente extensión de degradación proteolítica de la molécula y en consecuencia diferencias en el patrón de bandas satélites del FvW obtenido en los geles de alta resolución.

Dentro de este grupo II de EvW caracterizado por defecto cualitativo del FvW hay que incluir a las formas B, y IB, IC y ID.

EvW B: Su peculiaridad radica en la existencia de un doble pico del FvW en la inmunoelectroforesis cruzada.

EvW IB: También denominada plaquetar discordante. Muestra una disminución de la proporción relativa de los multímeros de mayor tamaño en plasma y en plaquetas.

EvW IC: Se caracteriza por una disminución o ausencia de las bandas satélites de cada multímero así como por alteraciones de su movilidad (más rápidas que en el FvW normal, además el tratamiento con DDAVP no modifica la anomalía estructural.

EvW ID: Recientemente hemos descrito esta nueva forma de EvW, probablemente transmitida de forma autosómica dominante, asociada a una deficiencia leve de FXII. El FvW, aunque mostraba todos los multímeros al analizarlo con geles de alta resolución, se pudo comprobar, que en plasma la banda central de cada multímero tenía una movilidad ligeramente inferior a lo normal así como una gran disminución de las bandas satélites. Tras la administración de DDAVP aparecen estas bandas satélites y el análisis de la subunidad tras el DDAVP muestra un comportamiento de fragmentación anormal no descrito previamente ni en sujetos normales ni en otros tipos de EvW. Así, tras el DDAVP se aprecia además del incremento transitorio del fragmento de 176 kDa un incremento, también transitorio, del fragmento de 189 kDa (lo opuesto a lo observado en sujetos normales).

3.2.b.2. Tipo II con hipersusceptibilidad del FvW a la ristocetina.

El subtipo IIB de EvW le sigue al IIA en orden de frecuencia. El FvW muestra un patrón variante y signos que evidencian una mayor degradación proteolítica, tales como discreto aumento de bandas satélites de cada multímero en algunos casos y mayor fragmentación de la subunidad nativa que la observada en el FvW normal (mayor proporción del fragmento de 176 kDa). Además, una propiedad especial del FvW es la de aglutinar plaquetas, bien normales o las del propio paciente en presencia de concentraciones bajas de ristocetina (RIPA presente a concentraciones de 0.4 mg o incluso inferiores de esta sustancia). Un hecho casi constante en este tipo de patología es la presencia de trombopenia o pseudotrombopenia particularmente cuando se elevan los niveles del FvW (un ejemplo típico es tras la administración de DDAVP) y la presencia de agregados plaquetares en el frotis de sangre perifé-

rica, tanto más frecuentes y extensos cuanto más se tarda en procesar la muestra de sangre extraída.

En algunos casos la trombopenia es ya basal y se intensifica en estados que se acompañan de elevación del FvW, lo cual puede ser debido a una excepcional hiperafinidad del FvW por los receptores plaquetares, indicando existencia de heterogeneidad dentro de este suptipo. En nuestra experiencia, las formas IIB que cursan con trombopenia ya en condiciones basales, constituyen las formas más difíciles de tratar clínicamente, incluso más que los tipos severos, dado que a diferencia de éstas no se trata de un simple problema de reposición del factor ausente sino de una proteína con hiperactividad funcional patológica que actúa tanto fuera de tiempo como de lugar.

EvW New York o Malmo: Comparte con la IIB la hipersusceptibilidad del FvW a la ristocetina, sin embargo el análisis multimérico es normal. Otra entidad en la que se observa esta hipersensibilidad del FvW a la ristocetina es la pseudoenfermedad de von Willebrand o enfermedad de von Willebrand de tipo plaquetar. El FvW muestra un patrón variante similar al IIB, y también pueden producirse trombopenias o pseudotrombopenias particularmente en situaciones que se acompañan de incremento de los niveles del FvW, sin embargo la particularidad de esta entidad es que el defecto es plaquetar y la alteración del FvW es secundaria, por ello se incluye dentro de las trombopatías. La adición de factor von Willebrand normal (por ejemplo en forma de crioprecipitado) a plaquetas de pacientes con pseudoenfermedad de von Willebrand produce su agregación espontánea.

De todo lo dicho se deduce que ante todo paciente con hipersusceptibilidad a la ristocetina debe analizarse la aglutinación del plasma para no confundir una forma IIB y una forma plaquetar.

3.2.b.3. EvW con unión defectuosa del FvW al FVIII. Recientemente se ha descrito esta nueva forma molecular de EvW en la que se demuestra una clara disminución de la capacidad del FvW de unir FVIII normal purificado. Los pacientes presentan un nivel bajo de FVIII y no siempre de FvW. Cuando el nivel de FvW es normal puede confundirse con una Hemofilia A. A diferencia de la Hemofilia A en la que existe un FvW normal capaz de estabilizar y transportar adecuadamente el FVIII exógeno infundido, los pacientes con este defecto nuevo muestran un aclaramiento del FVIII exógeno, tanto más cuanto más puro es el FVIII infundido. Este hecho corrobora el papel fisiológico del FvW normal como proteína portadora y protectora del FVIII. Esta entidad presenta un patrón de he-

rencia autosómico recesivo, y a pesar de poseer un nivel de FVIII normal los individuos heterocigotos para este defecto muestran una capacidad de unión del FvW al FVIII por debajo de la normalidad. Es importante el correcto diagnóstico de esta nueva entidad por las implicaciones terapéuticas que de él se derivan.

3.2.c. Forma severa de EvW o tipo III:

Se caracteriza por nivel de FVIII y especialmente de FvW (FvW:Ag y FvW:RCo) muy bajo o indetectable.

4. Genética molecular en la enfermedad de von Willebrand

Desde que en 1985 se consiguió clonar el gen del FvW se ha logrado progresar notablemente en la comprensión de algunos tipos de EvW. Parece obvio que dada la complejidad de la síntesis del FvW, dimerización, multimerización, secreción, etc, defectos en diferentes etapas del procesamiento pueden conducir a fenotipos similares de EvW.

El gen del FvW es muy complejo y de ahí la dificultad de su análisis, particularmente de cara a detectar sutiles cambios como mutaciones puntuales.

Las anomalías genéticas que motivan EvW pueden ser de varios tipos: grandes deleciones (presentes en pocos pacientes), mutaciones puntuales que motivan sustituciones de aminoácidos (este tipo de alteración ya es mucho más frecuente), y finalmente, pueden existir anomalías genéticas fuera del gen del FvW (y no hay que olvidar esta posibilidad) dado que el FvW es muy complejo, experimentando un procesamiento ulterior tras la síntesis inicial del precursor. Gracias al advenimiento de metodologías tipo PCR y electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (calor u otro tipo de agente desnaturalizador), ha sido posible la detección de diversos tipos de anomalías genéticas moleculares en la EvW.

4.1. Deleciones en la EvW.

Únicamente se han descrito deleciones del gen en seis familias, cinco de ellas asociadas a EvW tipo III. La excepción la constituye un paciente con una deleción aparentemente “de novo” de la porción media del gen del FvW aso-

ciada a un fenotipo II de EvW. Aunque este grupo de anomalías es pequeño parece evidenciarse una clara relación entre delección y desarrollo de inhibidores del FvW (aloanticuerpos frente al FvW). Según estos datos parece deducirse una prevalencia de EvW tipo III francamente baja; sin embargo entra dentro de lo posible que se hayan pasado por alto algunas delecciones debido al gran tamaño del gen y la hibridación cruzada con el pseudogén.

4.2. Otras anomalías del gen del FvW diferentes a delecciones.

Parece bastante evidente que cuando se excluyen delecciones como causas patogenéticas, resulta enormemente complejo la búsqueda de mutaciones sutiles que sean la causa de trastornos cuantitativos del FvW. El análisis mediante secuenciación directa de un DNA tan largo parece poco práctico. Este acercamiento implica polimorfismos de secuencia de DNA, identificados en los exones del FvW, valorados mediante PCR de DNA genómico y mRNA plaquetar. Cualquier defecto molecular que motive la pérdida de expresión del FvW mRNA de uno de los alelos permitiría la detección de ambos alelos al nivel del DNA genómico pero únicamente el alelo normal en el mRNA plaquetar. Este acercamiento podría permitir la detección de cualquier mutación tipo cis afectando la transcripción del mRNA, procesamiento nuclear o estabilidad del mRNA. Dada la complejidad del gen del FvW, un “splicing” aberrante podría subyacer con cierta probabilidad como mecanismo de EvW.

En la mayor parte de enfermos con el tipo I, el gen del FvW parece estar normal y tal vez el defecto pueda ser debido a anomalías del DNA más sutiles.

La primera mutación puntual responsable de EvW fue descrita en una variante tipo A. Análisis de secuenciación tras PCR del FvW mRNA, obtenido de plaquetas o directamente del exón 28 del DNA genómico, condujo a la identificación de al menos siete tipos diferentes de mutaciones en los pacientes con esta forma de EvW, generalmente ubicadas dentro del módulo de repetición de secuencia A2. En todos los casos analizados hasta ahora, se ha visto que estas mutaciones puntuales (que se traducen en sustituciones de un único aminoácido) son las responsables del defecto molecular. Así, la expresión de las secuencias mutantes mediante transfección en células de mamífero ha permitido descubrir diferentes mecanismos patogenéticos .

En unos casos la célula es capaz de sintetizar la molécula precursora, demostrándose en el interior de la célula incluso en cantidades mayores de lo nor-

mal, pero en el exterior sólo aparecen los multímeros de pequeño tamaño, indicando un defecto en el ulterior procesamiento del precursor que le impide una correcta multimerización. Por el contrario en otro grupo de pacientes se ha visto que el DNA del paciente, una vez ha sido clonado en una célula, ésta genera un FvW con multímeros de todos los tamaños en el interior de la misma pero posteriormente ya en el exterior o incluso (como se ha descrito en un paciente) en el interior de la célula los multímeros de gran tamaño sufren una degradación proteolítica. Estas observaciones parecen indicar la existencia de al menos dos mecanismos fisiopatológicos diferentes posibles responsables de la EvW tipo IIA: Una mayor susceptibilidad a la proteólisis; demostrándose en ellos sustituciones de aminoácidos individuales en una pequeña zona de la molécula del FvW que es la próxima a la de acción de la calpaína. Estas mutaciones puntuales próximas al lugar sensible a la calpaína explican la susceptibilidad mayor a la proteólisis del FvW de estos pacientes y la mayor fragmentación del mismo (con aumento de fragmentos de 176 y 140 kDa). El segundo tipo, motivado por una sustitución también de un aminoácido individual, permite la síntesis inicial del FvW pero no su completo procesamiento.

En la forma IIB también se han podido descubrir varios tipos de mutaciones puntuales que conllevan sustituciones de aminoácidos individuales, así como una inserción, localizados todos ellos en una estrecha zona (aproximadamente de 35 aminoácidos) del dominio del FvW para su unión a la GPIb codificada en el exón 28. Algunas de estas alteraciones se han visto en una única familia mientras que otras se han descubierto en varias familias. La expresión de mutaciones tipo Trp550—>Cys en un fragmento recombinante de FvW se asocia a una hipersusceptibilidad del mismo a la ristocetina en su interacción con las plaquetas. FvW recombinante completo que reproduce la mutación Arg 543—>Trp mostró el mismo fenómeno. Finalmente lo mismo se ha confirmado para mutaciones Arg 578—>Gln y Pro 574—>Leu. De todas ellas, cuatro suponen el 90% de las mutaciones IIB.

Finalmente, en relación con el trastorno del FvW que afecta su capacidad de interacción con el FVIII normal se han descubierto varios tipos de mutaciones puntuales. Una de ellas, la primera, ha sido la sustitución Thr28—> Met , encontrada en la denominada forma “Normandía”. También aquí el FvR recombinante que contiene esta sustitución demuestra una reducción muy notable de la capacidad de unión del FvW al FVIII. Otras tres mutaciones descritas al res-

pecto motivan sustituciones tipo Arg 53—>Try, Arg 91—>Gln. Nosotros hemos descrito recientemente una nueva familia con una mutación en el exón 19 (la primera descrita en este exón afectando a esta propiedad del FvW).

Un campo de gran relevancia en la EvW lo constituye el uso de marcadores polimórficos para realizar estudios familiares y ver formas de transmisión de la enfermedad. Se han utilizado en este sentido más de 12 fragmentos de restricción de longitud polimórfica y recientemente Peake y colaboradores han descrito una región repetitiva de longitud polimórfica (cuyo tamaño depende del número variable de repeticiones de una secuencia concreta, VNTR) localizada en el intrón 40 del gen del FvW que se puede detectar fácil y rápidamente utilizando la técnica de amplificación por PCR. Este marcador VNTR está siendo altamente informativo en los estudios familiares de la EvW.

No cabe duda que gracias a estos nuevos y poderosos métodos de análisis del DNA y RNA van a permitir realizar un diagnóstico más precoz y preciso en los años venideros.

REFERENCIAS

- 1.- Baruch D., Bahnak B., Girma J.P., Meyer D. von Willebrand factor and platelet function. *Bailliere's Clin. Haematol.* 1989; 2(3):627-672.
- 2.- Batlle J., López Fernández M. F.: Laboratory assays for von Willebrand factor. En Zimmerman TS and Ruggeri ZM ed. *Coagulation and Bleeding disorders. The role of factor VIII and von Willebrand factor.* New York, Marcel Dekker, Inc1989; 325-342.
- 3.- Batlle J., López Fernández M. F., López Berges C., Dent J., Berkowitz S. D., Zimmerman T. S.: Proteolytic degradation of von Willebrand factor after DDAVP administration in normal individuals. *Blood* 1987; 70:173-176.
- 4.- Batlle J., López Fernández M.F., Lasierra J.,: von Willebrand's disease Type IIC with different abnormalities of von Willebrand factor in the same sibship. *Am J Hematol* 1986; 22: 177-188.
- 5.- Batlle J. López Fernández M.F., Campos M,. The heterogeneity of type IIA von Willebrand's disease: studies with proteinase inhibitors. *Blood* 1986; 68:1207-1212.
- 6.- Berkowitz S. D., Dent J., Roberts, J. R., Fujimura Y., Plow E. F., Titani K., Ruggeri Z. M., Zimmerman T. S.: Epitope mapping of von Willebrand factor subunit distinguishes fragments present in normal and IIA von Willebrand disease from those generated by plasmin. *J. Clin. Invest.* 79:524, 1987.
- 7.- Berkowitz S. D., Ruggeri Z. M., Zimmerman T. S. von Willebrand disease. En Zimmerman T. S. and Ruggeri Z. M. eds. *Coagulation and Bleeding disorders. The role of factor VIII and von Willebrand factor.* New York, Marcel Dekker, Inc1989; 215-261.
- 8.- Ciavarella G., Ciavarella N., Antoncicchi S. High-resolution analysis of von Willebrand factor multimeric composition defines a new variant of type I von Willebrand disease with aberrant structure but presence of all size multimers (Type IC). *Blood* 1985; 66:1423-1429.
- 9.- Dent J. A., Berkowitz S. D., Ware J., Kasper C. K., Ruggeri Z. M.: Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6306, 1990.

- 10.– Federici A. B., Mannucci P. M., Lombardi R. Type IIIH von Willebrand disease: New structural abnormalities of plasma and platelet von Willebrand factor in a patient with prolonged bleeding time and borderline levels of ristocetin cofactor activity. *Am. J. Hematol* 1989; 32:287-293.
- 11.– Fujimura Y., Ruggeri Z. M., Zimmerman T.S. Structure and function of human von Willebrand factor. En Zimmerman TS and Ruggeri ZM eds. *Coagulation and Bleeding disorders. The role of factor VIII and von Willebrand factor.* New York, Marcel Dekker, Inc. 1989; 77-98.
- 12.– Ginsburg D., Bowie E. W.: Molecular Genetics of von Willebrand disease. *Blood* 79:2507, 1992.
- 13.– Ginsburg D., Konkle B. A., Cox Gill J. Molecular basis of human von Willebrand disease: Analysis of platelet von Willebrand factor mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86:3723-3727.
- 14.– Gralnick H. R., Williams S. B., McKeown L. P., Maisonneuve P., H. Jenneau C., Sultan Y., Rick M. E.: In vitro correction of the abnormal multimeric structure of von Willebrand factor in type IIA von Willebrand's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5968, 1985.
- 15.– Gralnick H. R., Williams S. B., McKeon L. P., Maisonneuve P., Jenneau C., Sultan Y.: A variant of type II von Willebrand disease with abnormal triplet structure and discordant effects of protease inhibitors on plasma and platelet von Willebrand factor structure. *Am. J. Hematol.* 1987; 24:259-266.
- 16.– Kinoshita S., Harrison J., Lazerson J., Abilgaard C. F. A new variant of dominant type II von Willebrand's disease with aberrant multimeric pattern of factor VIII-related antigen (type IID). *Blood* 1984; 63:1369-1371.
- 17.– Levene R. B., Booyse F. M., Chediak J. R., Zimmerman T. S., Livingston D. M., Lynch D. C.: Expression of abnormal von Willebrand factor by endothelial cells from a patient with type IIA von Willebrand disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, 84:6550.
- 18.– López Fernández M. F., Batlle J., Ruggeri Z. M., Zimmerman T. S. Secretion of von Willebrand factor from platelets. *Methods Enzymol.* 1989; 169:244-250.
- 19.– López Fernández M. F., Blanco López M. J., Castiñeira M. P., Batlle J.: Further evidence for recessive inheritance of von Willebrand disease with

- abnormal binding of von Willebrand factor to factor VIII. *Am. J. Hematol.* 40:20, 1992.
- 20.– López Fernández M. F., González Boullosa R., Blanco López M. J., Pérez Casal M., Batlle J. Abnormal proteolytic degradation of vWF after DDAVP infusion in a new subtype of von Willebrand disease (ID). *Am. J. Hematol.* 1991 ; 36:163-170.
- 21.– López Fernández M. F., López Berges C., Martín R., Nieto J., Batlle J. Platelet and plasma von Willebrand factor: Structural differences. *Thromb. Res.* 1986; 44: 125-128.
- 22.– Lyons S. E., Bruck M. E., Bowie E. J. W., Ginsburg D.: Impaired intracellular transport produced by a subset of type IIA von Willebrand disease mutations. *J. Biol. Chem.* 267:4424,1992.
- 23.– Mannucci P. M., Lombardi R., Federici A. B., Dent J. A., Zimmerman T. S., Ruggeri Z. M. A new variant of type II von Willebrand disease with aberrant multimeric structure of plasma but not platelet von Willebrand factor (IIF). *Blood* 1986; 68:269-274 .
- 24.– Nishinco M., Girma J. P., Rothschild C., Fressinaud E., Meyer D. New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII. *Blood* 1989; 74:1591-1599.
- 25.– Peake I. R., Bowen D., Bignell P., Liddell M. B., Sadler J. E., Standem G., Bloom A. L. Family studies and prenatal diagnosis in severe von Willebrand disease by polymerase chain reaction amplification of a variable number tandem repeat region of the von Willebrand factor gene. *Blood* 1990; 76:551-561.
- 26.– Ruggeri Z. M. Structure and function of von Willebrand factor: Relationship to von Willebrand's disease. *Mayo Clin. Proc.* 66:847, 1991.
- 27.– Ruggeri Z. M., Mannucci P. M., Lombardi R., Federici A. B., Zimmerman, T. S. Multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor following administration of DDAVP: Implications for pathophysiology and therapy of von Willebrand disease. *Blood* 1982; 59:1272-1278.
- 28.– Ruggeri Z. M., Nilsson I. M., Lombardi R., Holmberg L., Zimmerman T. S. Aberrant multimeric structure of von Willebrand factor in a new variant of von Willebrand's disease (Type IIC). *J. Clin. Invest* 1982; 70:1124-1127.

- 29.– Ruggeri Z. M., Ware J.: The structure and function of von Willebrand factor. *Thromb. Haemostas* 67:594, 1992.
- 30.– Ruggeri Z. M., Zimmerman T. S. Review. Von Willebrand factor and von Willebrand disease. *Blood* 1987; 70:895-904 .
- 31.– Sadler, J. E. The molecular biology of Human von Willebrand factor. En Zimmerman T. S. and Ruggeri Z. M. ed. *Coagulation and Bleeding disorders. The role of factor VIII and von Willebrand factor.* New York, Marcel Dekker, Inc1989; 117-136.
- 32.– Titani K., Marti Th., Takio K., Walsh. Primary structure of human von Willebrand factor. En Zimmerman T. S. and Ruggeri Z. M. ed. *Coagulation and Bleeding disorders. The role of factor VIII and von Willebrand factor.* New York, Marcel Dekker, Inc. 1989; 99-116.
- 33.– Wagner D. D. Storage and secretion of von Willebrand factor. En Zimmerman TS and Ruggeri Z. M. ed. *Coagulation and Bleeding disorders. The role of factor VIII and von Willebrand factor.* New York, Marcel Dekker, Inc. 1989; 161-175.
- 34.– Zimmerman T. S., Dent J., Ruggeri Z. M., Nanini L. H. Subunit composition of plasma vWF: cleavage is present in normal individuals, increased in IIA and IIB von Willebrand disease, but minimal in variants with aberrant structure of individual oligomers (Types IIC, IID and IIE). *J. Clin. Invest.* 1986; 77: 947-951.