

DIAGNÓSTICO DE LA ENFER- MEDAD DE VON WILLEBRAND

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

Francesca Stufano

Centro de hemofilia y trombosis Angelo Bianchi Bonomi
Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico
Fundación Luigi Villa
Milán, Italia

Luciano Baronciani

Centro de hemofilia y trombosis Angelo Bianchi Bonomi
Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico
Fundación Luigi Villa
Milán, Italia

Flora Peyvandi

Centro de hemofilia y trombosis Angelo Bianchi Bonomi
Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico
Fundación Luigi Villa
Departamento de fisiopatología y trasplantes
Università degli Studi di Milano
Milán, Italia



FMH

FEDERACIÓN MUNDIAL DE HEMOFILIA
FÉDÉRATION MONDIALE DE L'HÉMOPHILIE
WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA

Índice

Resumen	1
Introducción	1
Definición de la enfermedad de von Willebrand	1
Panorama general del diagnóstico de la EvW	2
Diagnóstico clínico	2
Diagnóstico de laboratorio	2
Diagnóstico fenotípico	2
Pruebas de primer nivel para el diagnóstico de la EvW	3
Pruebas de segundo nivel para el diagnóstico de la EvW	4
Problemas y consideraciones con respecto a los análisis de laboratorio	6
Clasificación de la EvW	8
EvW tipo 1	8
EvW tipo 2	8
EvW tipo 3	9
Síndrome von Willebrand adquirido	9
Diagnóstico de la EvW en países con pocos recursos	11
Conclusión	11
Nota de divulgación	15
Reconocimiento	15
Autoría	15
Abreviaciones	16

Publicado por la Federación Mundial de Hemofilia (FMH)
© Federación Mundial de Hemofilia, 2017

La FMH alienta la redistribución de sus publicaciones por organizaciones de hemofilia sin fines de lucro con propósitos educativos. Para obtener la autorización de reimprimir, redistribuir o traducir esta publicación comuníquese con el Departamento de programas y educación de la FMH, a la dirección indicada abajo.

Este texto fue traducido del inglés por Rosa María Dueñas-Ríos. La FMH desea agradecer a la Dra. Adriana Linares, Profesora de la Universidad Nacional de Colombia, Hematóloga pediátrica en HOMI y la Clínica Infantil Colsubsidio, por haber revisado la traducción de esta monografía al español.

Esta publicación se encuentra disponible en formato PDF en la Plataforma de aprendizaje electrónico de la FMH, en: eLearning.wfh.org

También pueden solicitarse copias adicionales a la siguiente dirección:

Federación Mundial de Hemofilia
1425, boul. René-Lévesque O. Bureau 1010
Montréal, Québec H3G 1T7 Canadá
Tel.: (514) 875-7944
Fax: (514) 875-8916
Correo-e: wfh@wfh.org
Internet: www.wfh.org

El objetivo de la serie *Tratamiento de la hemofilia* es proporcionar información general sobre el tratamiento y manejo de la hemofilia. La Federación Mundial de Hemofilia (FMH) no se involucra en el ejercicio de la medicina y bajo ninguna circunstancia recomienda un tratamiento en particular para individuos específicos. Las dosis recomendadas y otros regímenes de tratamiento son revisados continuamente, conforme se reconocen nuevos efectos secundarios. La FMH no reconoce, de modo explícito o implícito alguno, que las dosis de medicamentos u otras recomendaciones de tratamiento en esta publicación sean las adecuadas. Debido a lo anterior se recomienda enfáticamente al lector buscar la asesoría de un consejero médico y/o consultar las instrucciones impresas que proporciona la compañía farmacéutica antes de administrar cualquiera de los medicamentos a los que se hace referencia en esta monografía. Las afirmaciones y opiniones aquí expresadas no necesariamente representan las opiniones, políticas o recomendaciones de la Federación Mundial de Hemofilia, de su Consejo Directivo o de su personal.

Editor de la serie *Tratamiento de la hemofilia*: Dr. Johnny Mahlangu

DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND

Caracterización Fenotípica

Resumen

La enfermedad de von Willebrand (EvW) es el trastorno de la coagulación más común, causado por defectos hereditarios en la concentración, estructura y función del factor von Willebrand (FvW). La EvW se transmite como trastorno autosómico dominante o recesivo, y afecta tanto a hombres como a mujeres. El FvW es una glicoproteína multimérica de alto peso molecular que desempeña un papel fundamental, en condiciones de fuerte cizallamiento, en la agregación y adhesión plaquetaria, y en la estabilización del factor de coagulación sanguínea VIII (FVIII).

Para el diagnóstico exacto de la EvW se requieren varias pruebas de laboratorio. Estas pruebas se realizan de manera secuencial y se subdividen en detección inicial y pruebas de primer y segundo niveles. Por lo tanto, la clasificación de la EvW es relativamente compleja, pero su diagnóstico adecuado es importante para el manejo terapéutico de los pacientes. La caracterización molecular del gene del FvW (*FvW*) no es indispensable para el diagnóstico de la EvW en pacientes que se han sometido a pruebas fenotípicas. No obstante, si algunos de estos análisis no estuvieran disponibles, entonces el análisis molecular es indispensable para obtener un diagnóstico exacto. Asimismo, el análisis molecular podría ofrecer valiosa información adicional en el caso de pacientes bien caracterizados fenotípicamente (por ejemplo, cuando se requiere un diagnóstico prenatal). La monografía complementaria a esta, la número 56 de la serie *Tratamiento de la hemofilia*, de la FMH, titulada *Diagnóstico molecular de la enfermedad de von Willebrand*, ofrece un análisis profundo del enfoque genotípico para el diagnóstico de la EvW [1].

Juntas, estas dos monografías brindan orientación tanto a médicos como a especialistas de laboratorio sobre el diagnóstico fenotípico y genotípico exacto de pacientes con

síntomas hemorrágicos e historial familiar de hemorragias positivo, que se sospecha pudieran padecer la EvW.

Introducción

El factor von Willebrand (FvW) es una glicoproteína multimérica de alto peso molecular que participa en la hemostasia primaria, apoyando la adhesión y la agregación plaquetaria mediante su unión a los receptores plaquetarios de las glicoproteínas (GP) GPIIb/IIIa y GPIIb/IIIa, en condiciones de fuerte cizallamiento en el lugar de la lesión vascular [2]. Además, el FvW funciona como proteína transportadora del factor de coagulación VIII (FVIII), protegiéndolo de la degradación proteolítica y de una rápida depuración [3].

Definición de la enfermedad de von Willebrand

La enfermedad de von Willebrand (EvW) es el trastorno de la coagulación más común, causado por defectos hereditarios en la concentración, estructura y función del FvW. Los informes de prevalencia en la población en general varían considerablemente entre estudios, abarcando desde 0.1% hasta 1%, y dependen del tipo de pacientes seleccionados y de los criterios usados para el diagnóstico de la enfermedad [2]. Se transmite principalmente como trastorno autosómico dominante y es causada por defectos cuantitativos o cualitativos en el FvW [2,3]. La actual clasificación de la EvW se basa en defectos cuantitativos parciales o completos (EvW tipos 1 y 3) o defectos cualitativos (EvW tipo 2) en el FvW. A su vez, la EvW tipo 2 se divide en cuatro variantes (2A, 2B, 2M y 2N), con base en las características del fenotipo [2]. La EvW tipo 3 se transmite como trastorno autosómico recesivo, con una prevalencia aproximada de uno por millón en la población en general, pero su frecuencia es considerablemente mayor en regiones con tasas elevadas de consanguinidad [4].

Panorama general del diagnóstico de la EvW

Diagnóstico clínico

El método diagnóstico se inicia con la valoración médica de una persona que informa de síntomas hemorrágicos mucocutáneos. La valoración inicial debería tomar en cuenta el historial personal y familiar de manifestaciones hemorrágicas. El objetivo de la valoración del historial hemorrágico personal es identificar las características de las hemorragias, tales como espontaneidad, gravedad y localización.

Para facilitar el diagnóstico de los trastornos de la coagulación se han desarrollado diversas herramientas, algunas de las cuales son generales y otras específicas según los síntomas. La sección de herramientas para la valoración de hemorragias de la publicación de la Federación Mundial de Hemofilia (FMH) titulada *Compendio de herramientas de valoración*¹ ofrece evaluaciones de las herramientas más útiles en el ejercicio actual [e. g.: el cuestionario sobre hemorragias en los *Marcadores moleculares y clínicos para el diagnóstico y tratamiento del tipo 1 de la EvW (MCMDM-1 por sus siglas en inglés)*², y el *Evaluación pictórica (o pictograma) de pérdida de sangre (PBAC por sus siglas en inglés)*³].

La Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH por sus siglas en inglés) diseñó una herramienta de valoración de hemorragias (*BAT por sus siglas en inglés*)⁴. Este instrumento resulta útil en el entorno médico ya que puede ser usado para evaluar EvW o disfunción plaquetaria en pacientes que se sospecha pudieran padecer estos trastornos. Además, sirve para racionalizar la investigación de las hemorragias en el laboratorio y para evaluar la propensión de los pacientes a las mismas.

Diagnóstico de laboratorio

La EvW es un trastorno de la coagulación hereditario causado por una deficiencia cuantitativa y/o cualitativa del FvW. A continuación se describe un enfoque para el diagnóstico fenotípico de la EvW. El análisis molecular

también puede aportar información importante para complementar el diagnóstico de laboratorio, y se aborda detalladamente en la monografía complementaria de la presente, la número 56 de la serie de la FMH, *Tratamiento de la hemofilia*, titulada *Diagnóstico molecular de la enfermedad de von Willebrand* [1].

Diagnóstico fenotípico

El FvW es una glicoproteína multimérica y multifuncional con varios dominios que contienen diversos sitios de unión funcionales. Por lo tanto, se requiere más de una prueba para evaluar todas las funciones de FvW y, a menudo, el diagnóstico de la EvW resulta complicado. Hay diferentes ensayos bioquímicos disponibles para analizar las funciones de esta compleja glicoproteína, que es necesario realizar paso a paso, como se describe a continuación.

La valoración de laboratorio inicial de la hemostasia, conocida como 'pruebas de detección iniciales', abarca conteo sanguíneo completo (CSC), tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA), tiempo de protrombina (TP), y fibrinógeno (Figura 1). Estas pruebas no pueden excluir o confirmar la presencia de EvW, pero pueden indicar si una deficiencia de factor de coagulación pudiera ser la causa potencial de los síntomas hemorrágicos de un paciente [5]. Dado que los pacientes con EvW tipo 2B pueden presentar trombocitopenia, debe valorarse el conteo plaquetario. En la EvW, la deficiencia de FVIII es secundaria a la deficiencia o disfunción del FvW, su proteína portadora. Por lo tanto, en la EvW los resultados del TTPA son prolongados solamente si el nivel de FVIII es lo suficientemente reducido (i. e.: EvW tipo 3 o EvW tipo 2N). En algunos laboratorios también se realizan los ensayos de tiempo de sangría (TS) y analizador de la función plaquetaria (PFA-100®). No obstante, los resultados del TS son susceptibles a la variabilidad del operador, y la prueba también carece de sensibilidad [6]. Algunos estudios han demostrado que los resultados del ensayo PFA-100® son anormales en la mayoría de los pacientes con EvW; sin embargo, el

1 Compendio de herramientas de valoración, FMH. <http://elearning.wfh.org/>

2 MCMDM-1 VWD Bleeding Questionnaire. <http://elearning.wfh.org/>

3 Pictorial Blood Loss Assessment Chart. <http://elearning.wfh.org/>

4 ISTH Bleeding Assessment Tool. <http://elearning.wfh.org/>

ensayo PFA-100® carece de sensibilidad y especificidad para usarse como única prueba de detección [7,8].

En la Figura 2 se resume un algoritmo para el diagnóstico de la EvW, que abarca pruebas de primer y segundo niveles.

Pruebas de primer nivel para el diagnóstico de la EvW

Las pruebas de primer nivel miden el nivel plasmático de la actividad coagulante del FVIII (FVIII:C), el nivel del antígeno del FvW (FvW:Ag), y la función del FvW dependiente de las plaquetas (actividad de unión del FvW al receptor plaquetario GPIIb/IIIa), usualmente medida como actividad en presencia del cofactor ristocetina (FvW:RCO). Los resultados de estas pruebas deberían expresarse ya sea en unidades internacionales por decilitro (UI/dl) o en unidades internacionales por mililitro (UI/ml), según la norma de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [5].

FVIII:C

La FVIII:C se determina mediante un ensayo de coagulación de una etapa⁵ basado en el ensayo de TTPA, o mediante un ensayo de coagulación de dos etapas⁶. Los niveles de actividad del FVIII también se miden por medio de un ensayo cromogénico⁷ [9]. Entre estos, el más común es el ensayo de coagulación, que mide la capacidad del FVIII de un paciente para reducir el tiempo de coagulación de plasma deficiente en FVIII.

FvW:Ag

El ensayo FvW:Ag mide la concentración de la glicoproteína FvW en el plasma del paciente. El ensayo FvW:Ag se realiza con el método de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)⁸ o mediante inmunoensayo automatizado con (micropartículas de) látex (LIA).

Actividad de unión del FvW al receptor plaquetario GPIIb/IIIa

A continuación se explican las pruebas disponibles para medir la principal actividad funcional del FvW. La actividad de unión del FvW al receptor plaquetario GPIIb/IIIa generalmente se valora mediante el ensayo FvW:RCO, que mide la capacidad del FvW plasmático para aglutinar a las plaquetas en presencia de ristocetina [10]. Durante los últimos diez años se han incorporado nuevos ensayos para valorar la actividad de unión del FvW al receptor plaquetario GPIIb/IIIa a fin de superar las limitaciones del ensayo FvW:RCO [11]. Por lo tanto, el Comité Científico y de Normalización (SSC por sus siglas en inglés) de la *ISTH* aprobó una nueva nomenclatura que facilita la distinción entre ensayos que difieren en sus detalles funcionales [12]. La nomenclatura de consenso clasifica los ensayos que miden la actividad de unión del FvW al receptor plaquetario GPIIb/IIIa de la siguiente manera:

1) *Ensayos FvW:RCO*. Estas pruebas utilizan plaquetas intactas en diferentes formas (nativas, fijadas en formalina o liofilizadas reconstituidas) y ristocetina. Los ensayos FvW:RCO se subdividen en ensayos de primera generación (manuales), de segunda generación (semiautomatizados), de tercera generación (totalmente automatizados), de cuarta generación (totalmente automatizados modificados), y métodos de citometría de flujo.

No obstante, estos ensayos presentan algunas limitaciones, tales como un elevado coeficiente de variación (CV; que puede superar el 30% cuando los valores son <15 UI/dl), variabilidad de la ristocetina o del reactivo plaquetario de un lote a otro (ya sea preparado localmente o liofilizado comercialmente), y una inestabilidad intrínseca del sistema de ensayo. Los ensayos de primera y segunda generación también requieren mucho tiempo y están pobremente estandarizados. Una desventaja más es que el ensayo FvW:RCO mide

5 Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación: Manual de laboratorio, FMH. <http://elearning.wfh.org/> Sección 23: Ensayos de factor basados en el TTPA.

6 Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación: Manual de laboratorio, FMH. <http://elearning.wfh.org/> Sección 25: Ensayo de coagulación de dos etapas para el factor VIII:C.

7 Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación: Manual de laboratorio, FMH. <http://elearning.wfh.org/> Sección 26: Ensayo por método cromogénico del factor VIII:C.

8 Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación: Manual de laboratorio, FMH. <http://elearning.wfh.org/> Sección 30: Ensayo del antígeno del factor von Willebrand (FvW:Ag) por método ELISA).

dos parámetros: 1) la unión de la ristocetina al FvW; 2) la unión del FvW “activado” por la ristocetina a las plaquetas [12]. Flood *et al.* [13,14] describieron dos variantes de secuencia en la región de unión para la ristocetina del dominio A1 (p.P1467S y el alelo H de un polimorfismo común p.D1472H) que provocan falsas reducciones en los niveles de FvW:RCo. No obstante, el ensayo FvW:RCo se utiliza ampliamente y sigue siendo aceptado como el método de referencia para la valoración de la actividad del FvW dependiente de las plaquetas.

2) *Ensayos de unión del FvW a la GPIb α , desencadenada por ristocetina (FvW:GPIbR)*. Estas pruebas utilizan ristocetina y un fragmento de GPIb α capturado por un anticuerpo monoclonal (mAb) con el que se recubre una placa ELISA o una partícula magnética o de látex (para los ensayos automatizados mejorados). Como lo describieron Vanhoorelbeke *et al.* [15] y Federici *et al.* [16], hay diferentes anticuerpos disponibles para capturar el fragmento de GPIb α , que puede ser una proteína derivada de plasma o recombinante. Hay una buena correlación entre los ensayos FvW:RCo y FvW:GPIbR; si bien los ensayos FvW:GPIbR demostraron una mayor precisión, un mejor CV y un límite de detección más bajo [12].

3) *Ensayos de unión del FvW a la GPIb α con una mutación de ganancia de función (FvW:GPIbM)*. Estas pruebas utilizan fragmentos de GPIb α recombinantes con una mutación de ganancia de función (rGPIbM), que espontáneamente se unen al FvW sin ristocetina. Pueden utilizarse rGPIbM con diferentes mutaciones de ganancia de función. Sin embargo, no se detecta ninguna diferencia en la unión entre la rGPIbM y el FvW cuando se introducen dos de cualquiera de tres mutaciones de ganancia de función (p.G233V, p.D235Y y p.M239V) [17]. Los ensayos FvW:GPIbM utilizan rGPIbM capturada en una placa ELISA o en una partícula de látex, recubierta con un mAb. Se ha informado que los ensayos FvW:GPIbM se correlacionan con el ensayo habitual FvW:RCo; no obstante, la precisión, el CV y la sensibilidad de los ensayos más nuevos es mejor [11,18,19].

4) *Ensayo de actividad del FvW con base en su unión al anticuerpo monoclonal (FvW:Ab)*. Este se utiliza para el ensayo comercial automatizado inmunoturbidimétrico

mejorado con látex, en el que un mAb se dirige contra un epítipo en el dominio AI del FvW que participa en la unión de la GPIb α . Una de las ventajas de este ensayo es su aplicabilidad a diferentes plataformas y, por ende, su factibilidad para laboratorios no especializados. Dado que el ensayo FvW:Ab mide la unión del FvW a un mAb y no a la GPIb α , no está claro si este anticuerpo es capaz de imitar precisamente la unión de la GPIb α al FvW [20]. Por lo tanto, no puede considerarse un verdadero ensayo de actividad y tampoco recomendarse como sustituto del ensayo FvW:RCo.

Pruebas de segundo nivel para el diagnóstico de la EvW

Las pruebas de segundo nivel son necesarias para definir y clasificar las variantes de la EvW. Se aplican cuando se detectan niveles bajos de FvW y/o cuando se descubre una discrepancia entre la concentración de la proteína FvW y sus funciones dependientes de las plaquetas (i. e.: FvW:RCo/FvW:Ag <0.6). Niveles reducidos de FVIII relacionados con valores normales o casi normales para el FvW, que dan lugar a una relación FVIII:C/FvW:Ag <1 [21], podrían estar relacionados con la EvW tipo 2N o con hemofilia A leve.

FvW:CB

La interacción del FvW con el colágeno es fundamental en condiciones de fuerte cizallamiento para que se inicie el tapón plaquetario en los sitios de lesión. El principal sitio de unión del colágeno fibrilar es el dominio A3 del FvW [22], aunque también se ha informado de la interacción del dominio A1 con el colágeno tipos IV y VI [23,24]. El ensayo de la actividad de unión al colágeno (FvW:CB) mide la capacidad del FvW para unirse al colágeno. Como en el caso del FvW:RCo, los resultados del FvW:CB dependen del tamaño de los multímeros del FvW, lo que quiere decir que los multímeros más grandes se unen al colágeno con mayor afinidad que los pequeños. La sensibilidad y capacidad del ensayo FvW:CB para discriminar entre subtipos de la EvW depende de la fuente y del tipo de colágeno utilizado [25]. El ensayo FvW:CB puede usarse como sustituto del análisis de multímeros del FvW, siempre que esta última prueba no se encuentre disponible, a fin de valorar la ausencia de multímeros de alto peso molecular (MAPM). Aun si algunos estudios apuntan a que los ensayos FvW:CB pueden mejorar la diferenciación del tipo 2M de la EvW del tipo 2A, en la práctica médica y de laboratorio el ensayo FvW:CB no

forma parte de las pruebas habituales para la EvW [26,27]. Los defectos de unión al colágeno también se describen en la EvW tipo 2M (FvW:CB/FvW:Ag <0.6) debido a mutaciones en el dominio A3 [28,29].

Actualmente hay diversos kits ELISA disponibles comercialmente para evaluar esta función del FvW. Un ejemplo se describe en la publicación *Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación: Manual de laboratorio*⁹, pero muchos otros se han utilizado con éxito.

RIPA

Solamente se ha informado de unos cuantos métodos [30-33] que distinguen la EvW tipo 2B de otros tipos de EvW (e. g.: EvW tipo 2A o tipo 1). Entre estos métodos, la aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina (*RIPA* por sus siglas en inglés) es la más ampliamente utilizada [34]. El ensayo *RIPA*¹⁰, realizado con plasma rico en plaquetas (PRP) del paciente, evalúa la afinidad del FvW por el receptor plaquetario GPIIb/IIIa con diferentes concentraciones de ristocetina. Por lo tanto, la disponibilidad de una muestra de sangre fresca para este ensayo es obligatoria. Bajas concentraciones de ristocetina (<0.7 mg/ml) no provocan la aglutinación de las plaquetas en el PRP de sujetos normales, mientras que la misma cantidad de ristocetina podría causar aglutinación plaquetaria en el PRP de pacientes con EvW tipo 2B. Por el contrario, a mayores concentraciones de ristocetina (entre 0.7 y 1.2 mg/ml) capaz de inducir la aglutinación plaquetaria en sujetos normales, la aglutinación plaquetaria inducida por la ristocetina está alterada en pacientes con EvW tipo 3, 2A y 2M. Mutaciones con ganancia de función en el receptor plaquetario GPIIb/IIIa provocan la EvW de tipo plaquetario (EvW-TP), también conocida como pseudo-EvW. El ensayo *RIPA* no permite distinguir la EvW tipo 2B de la EvW-TP; no obstante, puede determinarse un diagnóstico diferencial mediante pruebas de mezcla de plaquetas [35] o del análisis molecular del gene del FvW y del gene de la GPIIb/IIIa.

Análisis de multímeros del FvW

El patrón multimérico del FvW plasmático es importante para su actividad funcional. Los MAPM son la forma más hemostáticamente activa del FvW. Estas moléculas se unen al colágeno y a las plaquetas con una afinidad considerablemente mayor que los multímeros de bajo peso molecular. Debido a su tamaño, los MAPM también son más eficaces para mediar la adhesión y agregación plaquetarias, especialmente en condiciones de fuerte cizallamiento [36]. El análisis de la estructura multimérica del FvW es complejo y consume tiempo, pero útil para el diagnóstico de la EvW.

El análisis multimérico de baja resolución del FvW¹¹ (geles de agarosa de baja concentración) puede detectar la pérdida de MAPM (Figura 3, panel A), permitiendo distinguir a los pacientes con EvW tipo 1 de los pacientes con EvW tipo 2, y distinguir el tipo 2A de la EvW [pérdida de MAPM y multímeros de peso molecular (MPM) intermedio] del tipo 2M (patrón multimérico normal). Los geles de resolución intermedia¹¹ (preparados con mayores concentraciones de agarosa) permiten observar la estructura multimérica interior, que muestra la estructura de tripletes de cada uno de los oligómeros. En una persona normal, el patrón de tripletes está formado por una banda central y dos sub-bandas externas [37]. En algunos pacientes con EvW pueden observarse alteraciones en la estructura de tripletes (Figura 3, panel B). Muy pronto estará disponible comercialmente un método semiautomatizado para el análisis multimérico de baja resolución del FvW.

FvW:FVIII

El ensayo de unión FvW-FVIII (FvW:FVIII) evalúa la capacidad del FvW de unirse al FVIII. Este ensayo es indispensable para diferenciar un diagnóstico de EvW tipo 2N de uno de hemofilia A leve, dado que ambos trastornos están relacionados con una reducción moderada de los niveles plasmáticos de FVIII, y niveles normales de FvW:Ag y FvW:RCo (FVIII:C/FvW:Ag <1) [21]. La prueba FvW:FVIII mide la capacidad del FvW plasmático de unirse a un FVIII exógeno, usando un inmunoensayo en

9 Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación: Manual de laboratorio, FMH. <http://elearning.wfh.org/> Sección 31: Ensayo de unión al colágeno del factor von Willebrand (FvW:CB).

10 Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación: Manual de laboratorio, FMH. <http://elearning.wfh.org/> Sección 39: Pruebas de la función plaquetaria.

11 Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación: Manual de laboratorio, FMH. <http://elearning.wfh.org/> Sección 33: Análisis multimérico del FvW.

fase sólida¹² [38]. En el diagnóstico diferencial, los resultados obtenidos de este ensayo pueden ser: 1) una capacidad de unión normal del FvW al FVIII, lo que genera un diagnóstico de hemofilia A leve; 2) una capacidad de unión marcadamente reducida del FvW al FVIII, que da lugar a un diagnóstico de EvW tipo 2N. Existe la posibilidad de un tercer resultado utilizando este ensayo: una capacidad de unión moderadamente reducida del FvW al FVIII. Este hallazgo es habitual en portadoras asintomáticas de la EvW tipo 2N, quienes generalmente presentan niveles normales de FVIII (FVIII:C/FvW:Ag >1), y también se observa en algunos pacientes con variantes IIE de la EvW tipo 2A.

Hay kits ELISA disponibles comercialmente para medir FvW:FVIIIb.

Análisis del FvW intraplaquetario

Además de los cuerpos Weibel-Palade de las células endoteliales, el FvW también se almacena dentro de los gránulos α de las plaquetas. En contraste con el FvW plasmático, el FvW plaquetario está enriquecido con multímeros de FvW hemostáticamente activos de tamaño ultra grande o inusualmente grande (FvW-UL) [39]. El FvW plaquetario puede evaluarse usando los mismos ensayos adoptados para el FvW plasmático (FvW:Ag, FvW:RCo, FvW:CB y análisis multimérico). No obstante, para interpretar correctamente los resultados de cada ensayo, es necesario primero establecer un rango normal, obtenido de una pequeña población de individuos sanos. Como en el caso del ensayo RIPA, las plaquetas deben aislarse a partir de una muestra de sangre fresca. Hay pocos métodos disponibles para la extracción del FvW de las plaquetas, y ninguno está estandarizado. Mannucci *et al.* [40] describieron tres diferentes subgrupos de pacientes con base en los niveles de FvW plaquetario: 1) 'plaquetario bajo': pacientes con FvW:Ag y FvW:RC plaquetarios reducidos; 2) 'plaquetario normal': pacientes con FvW:Ag y FvW:RCo plaquetarios dentro del rango normal; y 3) 'plaquetario discordante', pacientes con concentraciones normales de FvW:Ag plaquetario, pero niveles desproporcionadamente reducidos de FvW:RCo plaquetario. Se ha demostrado que estas subcategorías predicen la respuesta del FvW plasmático del paciente después de la administración de

DDAVP (desmopresina: 1-desamino-8-D-arginina vasopresina), por lo que podrían ser clínicamente relevantes.

Prueba de infusión de desmopresina (DDAVP)

La desmopresina ó DDAVP es un derivado sintético de la hormona antidiurética vasopresina que estimula la liberación de FvW de los cuerpos Weibel-Palade de las células endoteliales [41,42]. La desmopresina se ha utilizado para el tratamiento de la forma leve de la EvW, y su mecanismo farmacológico de acción e indicaciones se han estudiado ampliamente [3,41]. La prueba de desmopresina puede utilizarse para valorar la respuesta del paciente antes de la administración de desmopresina para la prevención o el tratamiento de hemorragias. Para probar la respuesta de un paciente se administra, ya sea por vía subcutánea o intravenosa, una dosis terapéutica de desmopresina (0.3 μ g/kg peso corporal), y se miden los valores FvW:Ag, FvW:RCo al inicio y 1, 2 y 4 horas después de la infusión. La valoración 4 horas después de la infusión es necesaria a fin de identificar a pacientes con una depuración acelerada del FvW quienes serían potenciales candidatos para tratamientos alternos [43].

Proporción ppFvW/FvW:Ag

Un incremento en la proporción entre el propéptido del FvW (ppFvW) y el FvW (ppFvW/FvW:Ag), que constituye un marcador de depuración acelerada del FvW, se ha encontrado en pacientes con EvW y en pacientes con coagulación intravascular diseminada [44-46]. Hay diferentes kits ELISA disponibles comercialmente para medir la concentración plasmática del ppFvW. No obstante, este ensayo es relativamente nuevo y no se utiliza ampliamente en el diagnóstico de la EvW.

Evaluar la proporción ppFvW/FvW:Ag es una buena alternativa a la prueba de desmopresina a fin de investigar la tasa de depuración del FvW [47].

Problemas y consideraciones con respecto a los análisis de laboratorio

Tipos de sangre ABO y envejecimiento

Los tipos sanguíneos ABO tienen un efecto importante en las concentraciones plasmáticas de FvW y FVIII [48]. Los sujetos con grupo sanguíneo tipo O tienen concentraciones de FvW cerca de 25% más bajas que personas

12 Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación: Manual de laboratorio, FMH. <http://elearning.wfh.org/>

Sección 32: Ensayo de unión del factor VIII para el diagnóstico de la variante Normandía de la enfermedad de von Willebrand.

con tipos sanguíneos diferentes al tipo O, como consecuencia de la mayor depuración del FvW relacionada con la presencia de antígenos O en las moléculas del FvW, en comparación con moléculas de FvW que presentan antígenos diferentes a O [49].

Los niveles tanto de FvW como de FVIII aumentan con la edad. En adultos, el FvW se incrementa en aproximadamente 1% a 2% por año [50].

Problemas previos a los análisis

La fase preanalítica abarca diversos procedimientos, desde preparación del paciente hasta recolección, manejo, transporte y almacenamiento de muestras. La fase preanalítica es considerada la parte más vulnerable de la totalidad del proceso de pruebas, y los problemas preanalíticos representan cerca del 70% de los errores de los laboratorios clínicos.

Antes de las pruebas de laboratorio es importante tomar en cuenta el historial clínico del paciente a fin de detectar cualquier situación patológica que se sabe puede afectar los niveles de FvW (e. g.: enfermedades cardiovasculares, trastornos autoinmunes, cáncer, enfermedades linfoproliferativas o mieloproliferativas, e hipotiroidismo). También deben tomarse en cuenta embarazo y estrógeno / anti-conceptivos orales ya que están relacionados con un incremento en los niveles de FvW y otros factores de la coagulación. Es importante evitar el estrés (e. g.: ansiedad o llanto en el caso de niños asustados) antes de tomar la muestra de sangre [51] ya que incrementan las proteínas de fase aguda (e. g.: FvW y FVIII). No se recomienda el ejercicio físico hasta dos horas antes de las tomas de sangre y los sujetos deberían tener un mínimo de cinco minutos de reposo antes de la toma. Otros factores externos, tales como inflamación y cirugía, incrementan los niveles plasmáticos de FvW [51]. Por consiguiente, es necesario repetir las pruebas en sujetos en los que se sospecha la EvW y los bajos niveles de FvW deben confirmarse con por lo menos dos tomas de sangre en ocasiones diferentes.

Recolección, manejo y transporte de muestras

El Colegio de Patólogos Estadounidenses (CAP por sus siglas en inglés), así como el Instituto de Normas de Laboratorio Clínico (CLSI por sus siglas en inglés y

anteriormente *NCCLS*), recomiendan la recolección de sangre en una solución tamponada de citrato al 3.2%. Después de la recolección es importante mezclar inmediatamente la sangre mediante inversión a fin de garantizar la distribución del anticoagulante: debe evitarse agitarla ya que esto induce la hemólisis y/o la activación de plaquetas y factores. Las muestras hemolizadas, ictericas y lipémicas pueden afectar los resultados de las pruebas. Antes de su procesamiento en el laboratorio, las muestras deben evaluarse para detectar la presencia de precipitados, coágulos, hemólisis, ictericia y lipemia^{13,14}. No obstante, la mayoría de los instrumentos de coagulación totalmente automatizados cuentan con un sistema de detección de longitud de ondas múltiple para detectar muestras inadecuadas.

La temperatura y el transporte son variables clave en el manejo de muestras. No se recomienda el transporte de sangre completa en condiciones de refrigeración. Las muestras deberían transportarse a temperatura ambiente (15°C–25°C) en el menor tiempo posible [52,53]. De hecho, el manejo inadecuado de sangre completa (i. e.: transporte a temperaturas de 2°C–8°C) antes de su centrifugación puede causar reducciones falsas del FvW y del FVIII [51].

Después de su extracción, la sangre entera debe procesarse rápidamente (idealmente en un plazo de una hora) para obtener plasma. Los ensayos de FvW deberían realizarse en plasma ‘pobre en plaquetas’ o ‘sin plaquetas’¹³; para garantizar la eliminación de las plaquetas, los tubos de muestras podrían necesitar un doble centrifugado. Después de la centrifugación, si los ensayos fueran a realizarse dentro de las siguientes dos horas, los tubos de muestra deberán permanecer tapados y a temperatura ambiente. Si no fuera posible realizar las pruebas al plasma dentro de las siguientes dos horas, entonces las muestras deberían congelarse, de preferencia a una temperatura de –70°C o menor, y analizarse dentro de los 18 meses siguientes [51]. Si el plasma no se centrifugó adecuadamente, durante el proceso de congelamiento podrían liberarse proteasas o partículas de la membrana plaquetaria que podrían afectar los resultados de las pruebas de FvW.

Las muestras congeladas pueden deteriorarse durante el transporte; se recomienda su entrega rápida y las alícuotas

13 NCCLS H51-A Ed.1 (2002): <https://infostore.saiglobal.com/>

14 NCCLS H21-A4 Ed.4 (2003): <https://infostore.saiglobal.com/>

deberían entregarse en hielo seco. Para evitar la formación de crioprecipitado, antes de realizar las pruebas, las muestras de plasma congelado deberían descongelarse durante por lo menos cinco minutos en un baño de agua a una temperatura de 37°C. Después de esto, las muestras deberían revolverse suavemente.

Clasificación de la EvW

Como se mencionó anteriormente, la actual clasificación de la EvW se basa en defectos cuantitativos parciales o completos (EvW tipos 1 y 3) o defectos cualitativos (EvW tipo 2) del FvW. La clasificación anterior restringía la EvW a mutaciones del gene del FvW [54], pero este criterio se ha ampliado (Cuadro 1). Pudiera ser posible que mutaciones en otros genes pudieran generar un trastorno indistinguible de la EvW, causado por mutaciones intragénicas del *FvW* [34]. La monografía complementaria de esta, TOH 56, *Diagnóstico molecular de la enfermedad de von Willebrand*, ofrece un análisis detallado del enfoque genotípico para el diagnóstico de la EvW [1].

EvW tipo 1

La EvW tipo 1 se caracteriza por una deficiencia cuantitativa parcial de FvW. Las manifestaciones hemorrágicas en pacientes con EvW tipo 1 se atribuyen a un decremento en la concentración de FvW, y no a una disminución selectiva en los multímeros grandes hemostáticamente eficaces o a anomalías específicas en los sitios de unión de los ligandos. El hallazgo de laboratorio habitual en casos de EvW tipo 1 son niveles reducidos de FvW con actividades funcionales normales del FvW en comparación con FvW:Ag. La proporción de MAPM en relación con la totalidad de multímeros del FvW es normal o no está particularmente reducida [34]. La EvW tipo 1 generalmente se hereda con un patrón autosómico dominante, aunque se ha informado de casos graves de EvW tipo 1 debidos a mutaciones heterocigotas compuestas [55].

EvW tipo 2

La clasificación de la EvW tipo 2 se basa en defectos funcionales específicos del FvW que afectan la agregación y/o adhesión plaquetaria, o que afectan la supervivencia del FVIII plasmático [34]. El Cuadro 2 ofrece un resumen de las variantes cualitativas del FvW (EvW tipo 2) que se describen con mayor detalle a continuación.

EvW tipo 2A

La EvW tipo 2A se caracteriza por una disminución en la adhesión del FvW dependiente de las plaquetas debido a una deficiencia selectiva de los MAPM. La EvW tipo 2A se caracteriza por una deficiencia relativa variable de multímeros grandes. La pérdida de multímeros grandes se relaciona con un decremento en las interacciones FvW-plaquetas (i. e.: FvW:RCo) y en las interacciones FvW-tejido conectivo (i. e.: FvW:CB) [56] en relación con FvW:Ag. La EvW tipo 2A constituye un grupo de variantes heterogéneas (anteriormente clasificadas como IIA, IIE, IID y IIC), en las que cada subgrupo se debe a un mecanismo patogénico molecular diferente. Con excepción de la EvW tipo 2A IIC, las variantes de la EvW tipo 2A se heredan con un patrón autosómico dominante. Actualmente, para discriminar entre las diferentes variantes del tipo 2A se requiere el análisis multimérico de resolución intermedia o la secuenciación del gene del FvW, y estas técnicas no están ampliamente disponibles [34]. Las variantes más comunes del tipo 2A, documentadas en la anterior versión de la clasificación de la EvW como IIA [57], se caracterizan por la pérdida de MPM alto e intermedio, que podría ser el resultado del defecto en la integración y secreción de los multímeros o de una mayor susceptibilidad intrínseca a la escisión por una desintegrina y metaloproteínasa con motivo trombospondina tipo 1, número 13 (ADAMTS-13) [34]. Como consecuencia de esto último, dichas variantes también presentan un incremento en las bandas de tripletes. La segunda variante más común de la EvW tipo 2A, anteriormente identificada como IIE [58], se caracteriza por una modesta pérdida de MAPM, relacionada con la ausencia de bandas de tripletes satélite debida a una menor susceptibilidad al efecto proteolítico de ADAMTS-13. Una variante poco común de la EvW tipo 2A, anteriormente identificada como IID [59], se caracteriza por la pérdida de MAPM relacionada con la presencia de bandas 'impares' en el análisis multimérico de resolución intermedia. Otro grupo poco común de variantes de la EvW tipo 2A, anteriormente identificado como IIC [58], se caracteriza por la pérdida de MPM alto e intermedio, relacionada con la ausencia de bandas de tripletes satélite debido a una menor susceptibilidad al efecto proteolítico de ADAMTS-13. Como se mencionó anteriormente, la EvW tipo 2A IIC se hereda con un patrón autosómico recesivo.

EvW tipo 2B

La EvW tipo 2B se debe a una mayor afinidad del FvW al receptor plaquetario GPIIb α y se caracteriza por ensayo RIPA aumentado (i. e.: aglutinación plaquetaria en presencia de bajas concentraciones de ristocetina) [30]. La mayor afinidad de esta variante del FvW por el receptor plaquetario GPIIb α resulta en una unión espontánea del FvW a las plaquetas *in vivo*, que da lugar a la formación de agregados, con la consiguiente pérdida de MAPM y, ocasionalmente, trombocitopenia [60]. Asimismo, la interacción espontánea entre el FvW y la GPIIb α acelera el efecto de escisión de ADAMTS-13 sobre el FvW, lo que genera una mayor disminución de MAPM [61]. La EvW tipo 2B se transmite como trastorno autosómico dominante.

La EvW tipo 2B comparte la mayoría de las características clínicas y de laboratorio de la EvW-TP, un trastorno hemorrágico autosómico dominante descrito por primera vez por Weiss *et al.* (1982) [62] y por Miller y Castella (1982) [63]. La EvW-TP también se caracteriza por un ensayo RIPA aumentado, pero en este caso la interacción espontánea entre el FvW y el receptor plaquetario GPIIb α se debe a la presencia de mutaciones de ganancia de función en el receptor plaquetario [64].

EvW tipo 2M

La EvW tipo 2M se caracteriza por una disminución en la adhesión del FvW dependiente de las plaquetas, no relacionada con la ausencia de MAPM. Mutaciones identificadas en pacientes con EvW tipo 2M afectan la interacción del FvW con la GPIIb α plaquetaria o con el colágeno, pero no afectan la integración de los multímeros (por ende, la inicial M). La menor adhesión plaquetaria disminuye la exposición de las subunidades del FvW al efecto de escisión de ADAMTS-13, lo que genera una reducción en las bandas satélite. La EvW tipo 2M se hereda con un patrón autosómico dominante. La mayoría de los casos de EvW tipo 2M se ha identificado con base en un valor para el FvW:RCo desproporcionadamente bajo en comparación con el FvW:Ag. Los análisis de primer nivel (i. e.; FVIII:C, FvW:Ag y FvW:RCo) para la EvW tipo 2M y 2A son similares y el diagnóstico diferencial se determina mediante el análisis de los multímeros [65]. Se ha informado de varios casos de pacientes con EvW tipo 2M que presentan un FvW:CB desproporcionadamente bajo en comparación con el FvW:Ag [28,29].

EvW tipo 2N

La EvW tipo 2N se caracteriza por una menor capacidad del FvW para unirse al FVIII. La primera descripción de esta variante fue en un paciente de la región de Normandía (por ende, la inicial N). En particular, hay una disminución del FVIII:C en comparación con el nivel normal de FvW:Ag, y el patrón multimérico del FvW es normal. Por lo tanto, la EvW tipo 2N puede diagnosticarse incorrectamente como hemofilia A leve, aunque la primera es un trastorno autosómico recesivo y la segunda se hereda como trastorno ligado al cromosoma X. El diagnóstico diferencial se determina mediante un inmunoensayo en fase sólida para valorar la capacidad de unión del FvW del paciente al FVIII (FvW:FVIII:B) [38]. Como alternativa puede realizarse el análisis genético tanto del *F8* como del *FvW*. En contraste con la EvW tipo 2B, tipo 2M y la mayoría de las variantes del tipo 2A, la EvW tipo 2N se hereda con un patrón autosómico recesivo.

EvW tipo 3

La EvW tipo 3 se caracteriza por una deficiencia casi completa de FvW tanto plasmático como plaquetario [66]. La EvW tipo 3 se hereda como rasgo recesivo, y los parientes heterocigotas generalmente presentan síntomas hemorrágicos leves o nulos [67,68]. Los valores de FvW:Ag, FvW:RCo y FvW:CB son <1 UI/dl y los niveles de FVIII:C también son muy bajos (<10 UI/dl) [4,69].

Síndrome von Willebrand adquirido

El síndrome von Willebrand adquirido (SvWA) es un trastorno de la coagulación poco común relacionado con defectos en la concentración, estructura o función del FvW. El SvWA se presenta en personas sin historial personal o familiar previo de hemorragias. El síndrome está relacionado con enfermedades linfoproliferativas o mieloproliferativas, enfermedades cardiovasculares, trastornos autoinmunes y cáncer, y generalmente se presenta en personas de edad avanzada. Los resultados de laboratorio para el SvWA son similares a los de la EvW y pueden abarcar disminución en los valores de FvW:Ag, FvW:RCo y FVIII:C. La distribución de los multímeros del FvW puede ser normal, pero podría haber ausencia de MAPM, como ocurre en la EvW tipo 2A [70,71]. Una mayor depuración del FvW plasmático es uno de los mecanismos patogénicos que se han propuesto para explicar la deficiencia de FvW en pacientes con SvWA [72].

Aloanticuerpos y autoanticuerpos del FvW

Los aloanticuerpos contra el FvW constituyen una complicación poco común, con una prevalencia que va de 5.8% a 9.5% en pacientes con EvW tipo 3 [73-75]. No hay informes de aparición de aloanticuerpos en pacientes con EvW de tipo 1 o tipo 2. Los pacientes con aloanticuerpos anti-FvW generalmente pierden o carecen de la respuesta hemostática a la infusión de concentrados de FvW. Los pacientes en los que se presenta un inhibidor, particularmente pacientes con títulos elevados de aloanticuerpos anti-FvW, pueden sufrir reacciones anafilácticas graves o que ponen en peligro la vida cuando vuelven a ser expuestos al FvW. Estos casos se caracterizan por la activación del sistema del complemento y la formación de complejos inmunes [75].

Mientras que los aloanticuerpos anti-FvW son exclusivos de los pacientes con EvW tipo 3 repetidamente expuestos al FvW, los autoanticuerpos desempeñan un papel en la patogénesis de algunos pacientes con SvWA, especialmente en quienes padecen trastornos linfoproliferativos. En contraste con la hemofilia adquirida, que se atribuye a anticuerpos neutralizantes contra el FVIII, diversos mecanismos patogénicos pueden causar trastornos estructurales o funcionales del FvW. Entre estos se cuentan autoanticuerpos que interfieren ya sea con la función plaquetaria [76,77] o con la unión al colágeno [78,79], o aumentando la depuración del FvW plasmático del paciente [72]. Solamente 20% de los pacientes con SvWA tienen anticuerpos contra el FvW, lo cual indica que los métodos disponibles podrían no ser adecuadamente sensibles para detectar anticuerpos o que el SvWA pudiera no siempre tener una base autoinmune [5]. No obstante, la presencia de autoanticuerpos anti-FvW, junto con la aparición tardía de la diátesis hemorrágica, el historial familiar de hemorragias negativo, los hallazgos de laboratorio similares a la EvW, y la presencia de un trastorno subyacente generalmente relacionado con el SvWA, contribuyen a apoyar el diagnóstico de SvWA. Asimismo, el seguimiento de los niveles de FvW y de autoanticuerpos anti-FvW podría ayudar a los médicos a monitorear la eficacia del tratamiento.

Ensayo para la detección de aloanticuerpos anti-FvW

No hay un método de laboratorio estandarizado para la identificación de aloanticuerpos anti-FvW. Los ensayos disponibles están basados en el principio de un estudio de mezclas para demostrar la inhibición de la función del FvW dependiente de las plaquetas, aunque existen recomendaciones para evaluar la función del FvW más ampliamente (incluyendo su unión al colágeno y al FVIII) [80]. Los ensayos de mezclas imitan a los ensayos de Bethesda para la detección de inhibidores en casos de hemofilia. Las actividades del FvW se evalúan¹⁵ en una mezcla de plasma del paciente y en lotes de plasma normal después de dos horas de incubación a 37°C. El título del inhibidor anti-FvW se calcula mediante la dilución actual de plasma del paciente que inhibe el 50% del lote de plasma normal en una dilución 1:2, en comparación con la mezcla de control. Los resultados negativos de los ensayos de mezclas no pueden excluir completamente la presencia de inhibidores dado que los aloanticuerpos pueden afectar regiones no funcionales de la proteína del FvW.

Ensayos para la detección de autoanticuerpos anti-FvW

La presencia de autoanticuerpos parece estar relacionada con una tendencia hemorrágica más grave en pacientes con SvWA [81,82]. A diferencia de la hemofilia adquirida, que siempre se caracteriza por autoanticuerpos neutralizantes anti FVIII, en el SvWA los autoanticuerpos contra el FvW rara vez se identifican con pruebas de mezclas que detectan la actividad funcional del FvW. Estas pruebas podrían no detectar títulos bajos de anticuerpos que son clínicamente importantes. Por lo tanto, los estudios de mezclas rara vez son útiles para el diagnóstico clínico del SvWA. Siaka y Tiede describieron dos ensayos ELISA, usando FvW purificado adherido a las placas, para detectar autoanticuerpos anti-FvW [81,83] independientemente de su actividad neutralizante. Recientemente, Franchi *et al.* [84] describieron un nuevo método combinado (un ensayo ELISA seguido de un ensayo de confirmación) para detectar autoanticuerpos anti-FvW.

15 Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación: Manual de laboratorio, FMH. <http://elearning.wfh.org/>
Sección 34: Medición cuantitativa de los inhibidores del FVIII.

CUADRO 1. Cambios en la clasificación de la EvW

ANTERIOR	ACTUAL
La EvW es causada por mutaciones en el <i>locus</i> del FvW.	La EvW no se restringe a mutaciones del gene del FvW.
La EvW tipo 1 incluye una deficiencia cuantitativa parcial de FvW. La distribución y estructura de los multímeros del FvW plasmático es indistinguible de lo normal.	La EvW tipo 1 incluye una deficiencia cuantitativa parcial de FvW. El FvW plasmático podría contener subunidades mutantes, pero presenta una actividad funcional normal en relación con el nivel de antígeno. La proporción de multímeros grandes no está disminuida considerablemente.

EvW: enfermedad de von Willebrand; FvW: factor von Willebrand. (Adaptado con autorización de Sadler *et al*, JTH 2006) [34]

Diagnóstico de la EvW en países con pocos recursos

El diagnóstico de la EvW requiere de más de un ensayo, y algunos de ellos no están disponibles en todo el mundo. No obstante, hay solo unos cuantos ensayos que son indispensables para el diagnóstico de la EvW. Las pruebas de primer nivel indispensables son FVIII:C y FvW:Ag, con FvW:RCo a fin de confirmar o excluir un diagnóstico de EvW tipo 3. En la mayoría de los casos, estas pruebas también permiten el diagnóstico de la EvW tipo 1 y tipo 2, aunque no tienen la capacidad para distinguir entre las diferentes variantes de la EvW tipo 2 (i. e.: 2A, 2B, 2M y 2N).

El FVIII:C puede determinarse mediante un ensayo de coagulación de una etapa basado en el ensayo de TTPA¹⁶, técnica que puede realizarse con recursos muy limitados.¹⁷ El FvW:Ag puede medirse usando el método ELISA, ya sea con placas microtituladas previamente recubiertas, o recubriendo las placas microtituladas en el laboratorio.¹⁸ Para determinar el FvW:RCo, idealmente los laboratorios de países en vías de desarrollo tendrían acceso a un agregómetro y la preparación de plaquetas se realizaría en el mismo laboratorio, en presencia de ristocetina. También existen métodos manuales para la determinación del FvW:RCo usando placas que han sido lavadas y fijadas en el mismo laboratorio o que están disponibles en kits comerciales [85]. Si no se tuviera acceso a ninguna de

estas, las determinaciones de TTPA y de tiempo de sangría pueden generar pruebas para apoyar o excluir un diagnóstico de EvW tipo 3.

Es muy importante excluir la presencia de un inhibidor del FvW (aloanticuerpos anti-FvW) en pacientes con EvW tipo 3, particularmente en quienes solamente han estado expuestos a la terapia de reemplazo de FvW una vez o unas cuantas veces. La presencia de un inhibidor podría ocasionar una grave reacción anafiláctica, que pudiera incluso poner en peligro la vida, si estos pacientes volvieran a ser expuestos al FvW. Por ende, los ensayos de mezclas que imitan al ensayo de Bethesda constituyen una prueba de segundo nivel indispensable para el diagnóstico de la EvW, incluso en un contexto de recursos limitados.

Conclusión

El diagnóstico de laboratorio de la EvW puede resultar complejo debido a factores externos y a variables de laboratorio que pueden incidir en las concentraciones plasmáticas del FvW. Para realizar un diagnóstico exacto es necesaria una buena colaboración entre médicos y especialistas de laboratorio. Un diagnóstico fenotípico de EvW puede confirmarse mediante caracterización genotípica. La monografía complementaria de la presente, TOH 56, *Diagnóstico molecular de la enfermedad de von Willebrand*, ofrece un análisis profundo del enfoque genotípico para el diagnóstico de la EvW [1].

16 Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación: Manual de laboratorio, FMH. <http://elearning.wfh.org/> Sección 23: Ensayos de factor basados en el TTPA (Ensayo de una etapa de FVIII:C, FIX, FXI o FXII)

17 One-Stage Assay of Factor VIII (FVIII) – Lab Manual Video. <http://elearning.wfh.org/>

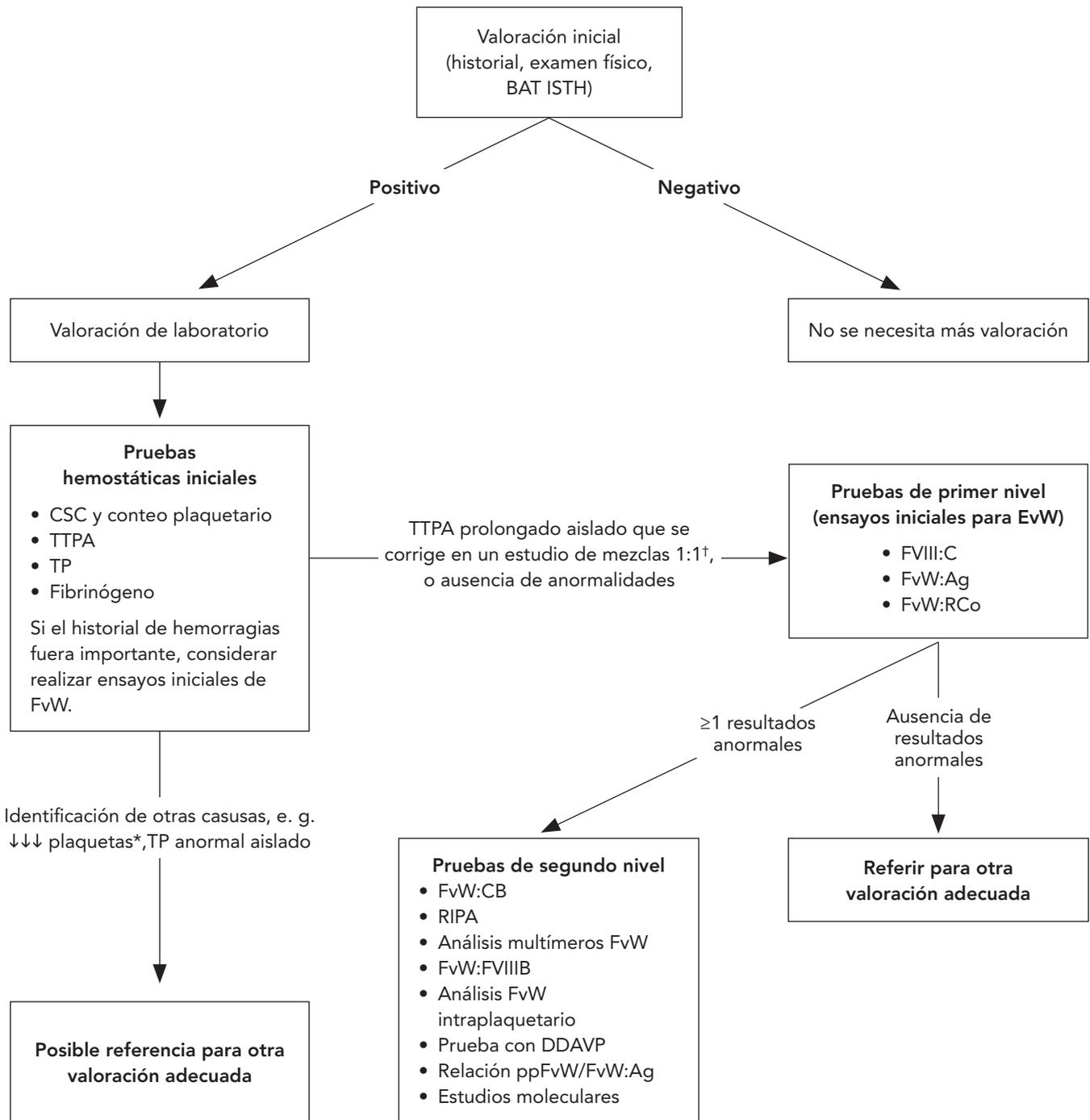
18 Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación: Manual de laboratorio, FMH. <http://elearning.wfh.org/> Sección 30: Ensayo del antígeno del factor von Willebrand (FvW:Ag) por método ELISA).

CUADRO 2. Principales características de la EvW tipo 2

Tipo de EvW	Patrón multimérico	Herencia	Rasgo diagnóstico característico	
2A	Deficiencia variable de MPM alto e intermedio; véase la sección específica a continuación.	Variable; véase la sección específica a continuación.	Decrementos en la unión del FvW a las plaquetas (i. e.: FvW:RCo) o en las interacciones entre el FvW y el tejido conectivo (i. e.: FvW:CB) en relación con FvW:Ag debidos a la pérdida de MPM alto e intermedio.	
	IIA	Pérdida de MPM alto e intermedio, relacionada con un aumento en las bandas de tripletes.	Dominante	Pérdida de MPM alto e intermedio. Mayor susceptibilidad a la acción proteolítica de ADAMTS-13
	IIE	Leve pérdida de MAPM, relacionada con ausencia de bandas de tripletes satélite.	Dominante	Leve pérdida de MAPM. Menor susceptibilidad a la acción proteolítica de ADAMTS-13.
	IID	Pérdida de MAPM, relacionada con presencia de multímeros impares entre oligómeros normales.	Dominante	Pérdida de MAPM, relacionada con presencia de bandas impares.
	IIC	Pérdida de MPM alto e intermedio, relacionada con ausencia de bandas de tripletes satélite.	Recesiva	Pérdida de MPM alto e intermedio. Menor susceptibilidad a la acción proteolítica de ADAMTS-13.
2B	Leve pérdida o pérdida de MAPM.	Dominante	Mayor afinidad por la GPIIb α plaquetaria. Ocasionalmente, trombocitopenia.	
2M	Patrón multimérico normal con una disminución en bandas satélite.	Dominante	Menor adhesión del FvW dependiente de las plaquetas, no relacionada con la ausencia de MAPM.	
2N	Patrón multimérico normal.	Recesiva	Menor capacidad de unión al FVIII.	

ADAMTS-13: una desintegrina y metaloproteínasa con motivo trombospondina tipo 1, número 13; EvW: enfermedad de von Willebrand; FVIII: factor VIII; FvW: factor von Willebrand; FvW:Ag: antígeno del FvW; FvW:CB: actividad de unión del FvW al colágeno; FvW:RCo: actividad del FvW en presencia del cofactor ristocetina; GPIIb α : glicoproteína Iba; MAPM: multímeros de alto peso molecular; MPM: multímeros de peso molecular.

FIGURA 1. Valoración de laboratorio inicial de la hemostasia



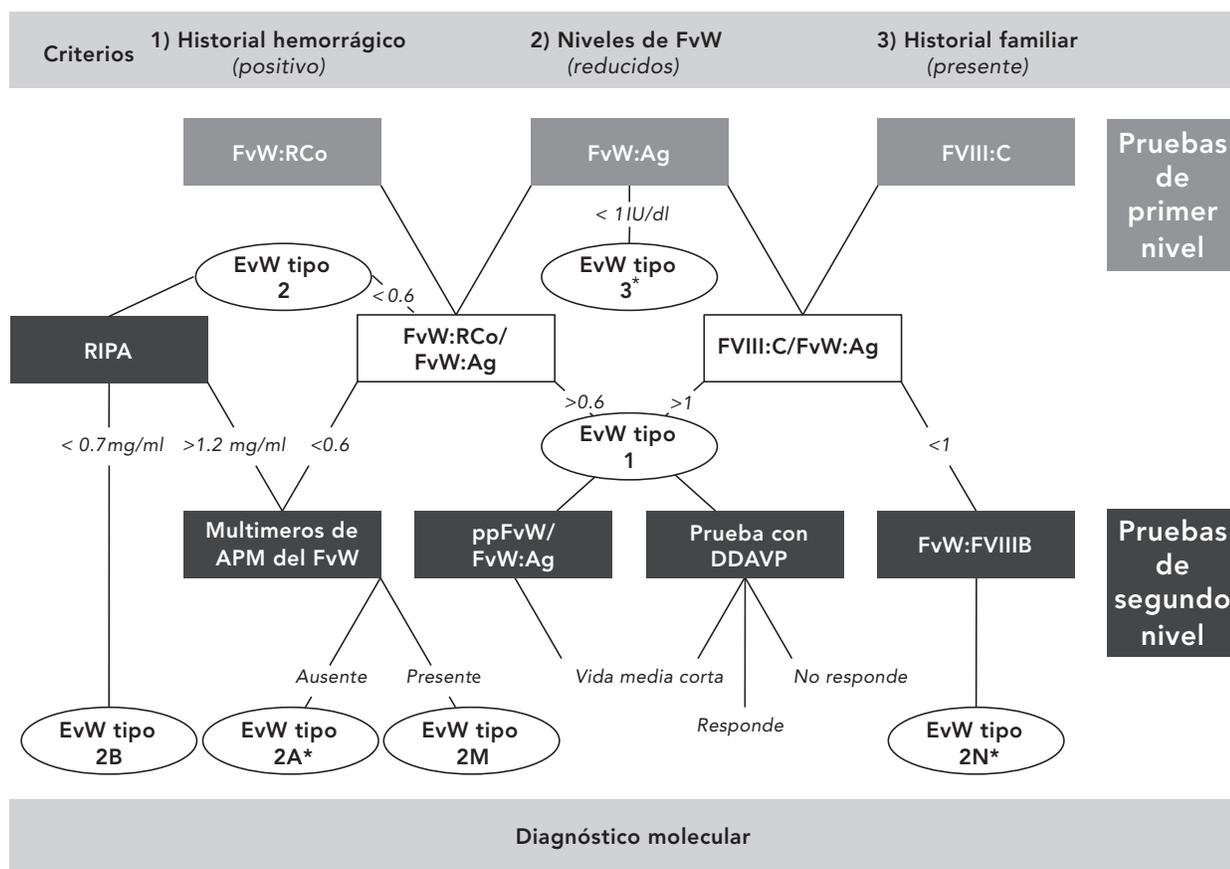
Si la evaluación clínica inicial apuntara a un trastorno de la coagulación deberían realizarse las 'pruebas de hemostasia iniciales', seguidas de o junto con los siguientes ensayos ('ensayos iniciales de FvW') indicados en el algoritmo (adaptado de Nichols, 2008) [5].

* Disminución aislada en el conteo plaquetario podría presentarse de vez en cuando en la EvW tipo 2B.

† No se debe sospechar la presencia de un inhibidor del FVIII si se obtiene corrección tanto inmediatamente como dos horas después de la incubación del estudio de mezclas del TTPA. Podría estar indicada la investigación de otros factores intrínsecos y de anticoagulante lúpico.

CSC: Conteo sanguíneo completo; DDAVP: desmopresina (1-desamino-8-D-arginina vasopresina); EvW: enfermedad de von Willebrand; FVIII: factor VIII; FVIII:C: actividad coagulante del FVIII; FvW: factor von Willebrand; FvW:Ag: antígeno del FvW; FvW:CB: actividad de unión del FvW al colágeno; FvW:FVIII B: ensayo de unión del FvW al FVIII; FvW:RCo: actividad del FvW en presencia del cofactor ristocetina; ppFvW: propéptido del FvW; PT: tiempo de protrombina; RIPA: aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina; TTPA: tiempo de trombolastina parcial activada.

FIGURA 2. Algoritmo propuesto para el diagnóstico y la clasificación de la EvW



APM: alto peso molecular; DDAVP: desmopresina:1-desamino-8-D-arginina vasopresina; EvW: enfermedad de von Willebrand; FVIII: factor VIII; FVIII:C: actividad coagulante del FVIII; FvW: factor von Willebrand; FvW:Ag: antígeno del FvW; FvW:FVIIIIB: ensayo de unión del FvW al FVIII; FvW:RCo: actividad del FvW en presencia del cofactor ristocetina; ppFvW: propéptido del FvW; RIPA: aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina.

Adaptado con autorización de Federici et al., (Haematologica 2009) [21].

La valoración inicial de un paciente en quien se sospecha EvW debería tener en cuenta el historial personal y familiar de manifestaciones hemorrágicas. Enseguida deberían evaluarse los niveles de FVIII:C, FvW:Ag y FvW:RCo.

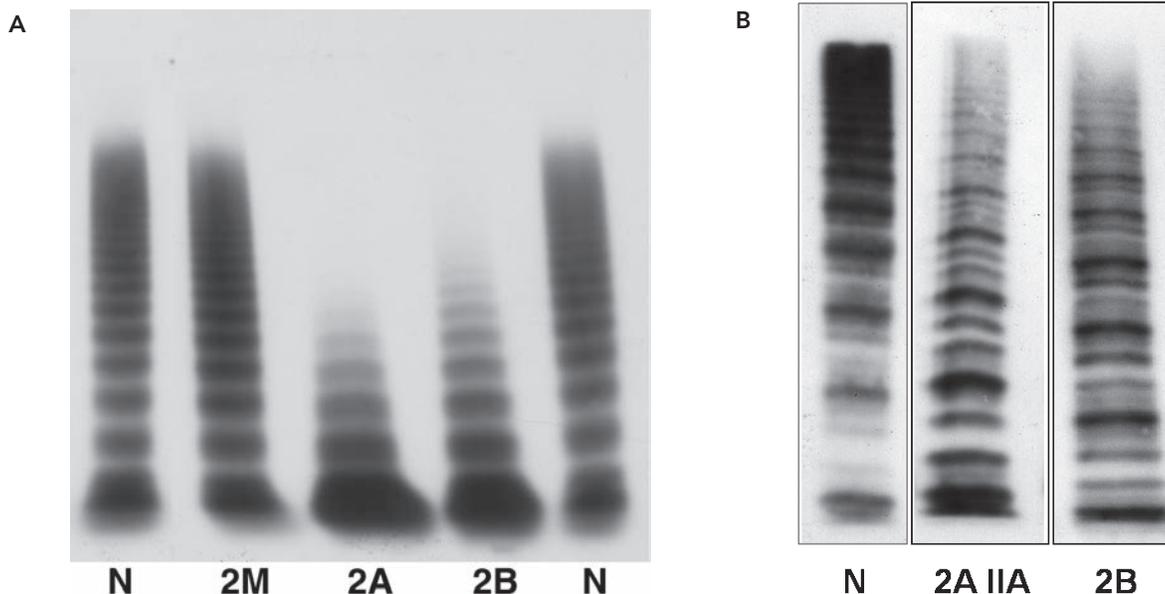
*No obstante, en el caso de tipos de la EvW con carácter hereditario recesivo (i. e.: EvW tipos 3, 2AIIc y 2N) el historial familiar del paciente podría ser negativo.

Pruebas de primer nivel: Puede diagnosticarse EvW tipo 3 en caso de FvW:Ag indetectable. El FVIII:C siempre se encuentra reducido en EvW tipos 3 y 2N. Puede encontrarse reducido o normal en todos los demás tipos de EvW. Una reducción proporcional tanto de FvW:Ag como de FvW:RCo con una relación FvW:RCo/FvW:Ag >0.6 sugiere EvW tipo 1. Cuando la relación FvW:RCo/FvW:Ag es <0.6, debería sospecharse EvW tipos 2A, 2B y 2M. Si la relación FVIII:C/FvW:Ag es <1 debería sospecharse EvW tipo 2N o hemofilia A leve, mientras que la relación FVIII:C/FvW:Ag >1 generalmente se relaciona con EvW tipo 1.

Pruebas de segundo nivel: La EvW tipo 2B se caracteriza por un ensayo RIPA aumentado (aglutinación plaquetaria con bajas concentraciones de ristocetina, <0.7 mg/ml), mientras que los resultados del ensayo RIPA se ven afectados en pacientes con EvW tipos 2A y 2M (>1.2 mg/ml). El análisis de baja resolución de multímeros del FvW puede detectar la pérdida de MAPM, permitiendo diferenciar la EvW tipo 2A (pérdida de MPM alto e intermedio) del tipo 2M (patrón multimérico normal). La relación ppFvW/FvW:Ag aumenta en la EvW tipo 1 con una reducción en la vida media del FvW. Las pruebas de infusión de desmopresina (DDAVP) pueden identificar a pacientes sin respuesta biológica, con respuesta biológica corta o con respuesta a la DDAVP. La prueba de unión FvW:FVIIIIB es esencial para determinar un diagnóstico diferencial entre hemofilia A leve y EvW tipo 2N, y debería realizarse siempre que la relación FVIII:C/FvW:Ag sea <1.

El diagnóstico fenotípico puede complementarse con el análisis molecular como una mayor aportación.

FIGURA 3. Comparación de la estructura multimérica del FvW plasmático de pacientes con EvW y de personas sanas. Análisis de multímeros del FvW de resolución baja (A) e intermedia (B).



Panel A. Las columnas 1 y 5 muestran una estructura multimérica normal, de una persona normal (control ó N). La columna 2 (EvW tipo 2M) muestra un patrón multimérico normal. La columna 3 (EvW tipo 2A IIA) y la columna 4 (EvW tipo 2B) muestran la ausencia de MAPM.

Panel B. La columna 1 (N) muestra una estructura multimérica normal, de una persona normal (control). La columna 2 (EvW tipo 2A IIA) y la columna 3 (EvW tipo 2B) muestran un aumento en las bandas de tripletes.

EvW: enfermedad de von Willebrand; FvW: factor von Willebrand; MAPM: multímeros de alto peso molecular.

Nota de divulgación

FP, LB y FS no tienen intereses que pudieran percibirse como causantes de un conflicto o sesgo con respecto a esta monografía.

Reconocimiento

Los autores agradecen los expertos comentarios de Sukesh Nair (Vellore, India) y Steve Kitchen (Sheffield, Reino Unido) sobre el contenido científico del manuscrito, y la labor editorial y de coordinación de Fiona Robinson.

Autoría

FS escribió el manuscrito. FP y LB realizaron una revisión crítica del mismo. Todos los autores aprobaron la versión final presentada para publicación.

Abreviaciones

ADAMTS-13	Una desintegrina y metaloproteinasa con motivo trombospondina tipo 1, número 13
AFP	Analizador de la función plaquetaria
BAT	<i>Bleeding Assessment Tool</i> Herramienta de valoración de hemorragias
CAP	<i>College of American Pathologists</i> Colegio de Patólogos Estadounidenses
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i> Instituto de Normas de Laboratorio Clínico
CSC	Conteo sanguíneo completo
CV	Coefficiente de variación
DDAVP	Desmopresina (1-desamino-8-D-arginina vasopresina)
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EvW	Enfermedad de von Willebrand
EvW-TP	Enfermedad de von Willebrand tipo plaquetario
FMH	Federación Mundial de Hemofilia
FVIII	Factor VIII
FVIII:C	Actividad coagulante del Factor VIII
FvW <i>FvW</i> (en cursiva)	Factor von Willebrand Gene del Factor von Willebrand
FvW:Ab	Ensayo de la actividad del factor von Willebrand con base en su unión al anticuerpo monoclonal
FvW:Ag	Antígeno del factor von Willebrand
FvW:CB	Actividad de unión al colágeno del factor von Willebrand
FvW:FVIII	Ensayo de unión del factor von Willebrand al FVIII
FvW:GPIbM	Ensayo de unión del factor von Willebrand a la GPIb α con una mutación de ganancia de función
FvW:GPIbR	Ensayo de unión del factor von Willebrand a la GPIb α , desencadenada por ristocetina
FvW:RCo	Actividad del cofactor de ristocetina
FvW-UL	Factor von Willebrand ultra grande (o inusualmente grande)
GP	Glicoproteína
ISTH	<i>International Society on Thrombosis and Haemostasis</i> Sociedad Internacional sobre Trombosis y Hemostasia
LIA	Inmunoensayo con (micropartículas de) látex
mAB	Anticuerpo monoclonal
MCMDM-1	Marcadores moleculares y clínicos para el diagnóstico y tratamiento del tipo 1 (de la EvW)
MPM	Multímeros de peso molecular
MAPM	Multímeros de alto peso molecular
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBAC	<i>Pictorial Bleeding Assesment Chart</i> Pictograma para la evaluación de pérdida de sangre
ppFvW	Propéptido del factor von Willebrand
PRP	Plasma rico en plaquetas
rGPIbM	Fragmentos de GPIb α recombinante con mutación de ganancia de función
RIPA	Ensayo de aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina
SSC	<i>Standardization and Scientific Committee</i> Comité Científico y de Normalización (de la ISTH)
SvWA	Síndrome von Willebrand adquirido
TOH	Tratamiento de la hemofilia
TP	Tiempo de protrombina
TS	Tiempo de sangría
TTPA	Tiempo de tromboplastina parcial activado
UI	Unidad internacional

Referencias

- Baronciani L, Goodeve A, Peyvandi F. Molecular diagnosis of von Willebrand disease. *Haemophilia* 2017; **23**: 188-97.
- Sadler JE, Mannucci PM, Berntorp E, bochkov N, Boulyjenkov V, Ginsburg D, Meyer D, Peake IR, Rodeghiero F, Srivastava A. Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand Disease. *Thromb Haemost* 2000; **84**: 160-74.
- Mannucci PM. Treatment of von Willebrand's Disease. *N Engl J Med* 2004; **351**: 683-94.
- Lak M, Peyvandi F, Mannucci PM. Clinical manifestations and complications of childbirth and replacement therapy in 385 Iranian patients with type 3 von Willebrand disease. *Br J Haematol* 2000; **111**: 1236-9.
- 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.
- Rodgers RP, Levin J. A critical reappraisal of the bleeding time. *Semin Thromb Hemost* 1990; **16**: 1-20.
- Cattaneo M, Federici AB, Lecchi A, Agati B, Lombardi R, Stabile F, Bucciarelli P. Evaluation of the PFA-100 system in the diagnosis and therapeutic monitoring of patients with von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 1999; **82**: 35-9.
- Quiroga T, Goycoolea M, Munoz B, Morales M, Aranda E, Panes O, Pereira J, Mezzano D. Template bleeding time and PFA-100 have low sensitivity to screen patients with hereditary mucocutaneous hemorrhages: comparative study in 148 patients. *J Thromb Haemost* 2004; **2**: 892-8.
- Potgieter JJ, Damgaard M, Hillarp A. One-stage vs. chromogenic assays in haemophilia A. *Eur J Haematol* 2015; **94**: 38-44.
- MacFarlane DE, Stibbe J, Kirby EP, Zucker MB, Grant RA, McPherson J. A method for assaying von Willebrand factor (ristocetin cofactor). *Thromb Diath Haemorrh* 1975; **34**: 306-8.
- Lawrie AS, Stufano F, Canciani MT, Mackie IJ, Machin SJ, Peyvandi F. A comparative evaluation of a new automated assay for von Willebrand factor activity. *Haemophilia* 2013; **19**: 338-42.
- Bodo I, Eikenboom J, Montgomery R, Patzke J, Schneppenheim R, Di Paola J. Platelet-dependent von Willebrand factor activity. Nomenclature and methodology: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2015; **13**: 1345-50.
- Flood VH, Friedman KD, Gill JC, Morateck PA, Wren JS, Scott JP, Montgomery RR. Limitations of the ristocetin cofactor assay in measurement of von Willebrand factor function. *J Thromb Haemost* 2009; **7**: 1832-9.
- Flood VH, Gill JC, Morateck PA, Christopherson PA, Friedman KD, Haberichter SL, Branchford BR, Hoffmann RG, Abshire TC, Di Paola JA, Hoots WK, Leissinger C, Lusher JM, Ragni MV, Shapiro AD, Montgomery RR. Common VWF exon 28 polymorphisms in African Americans affecting the VWF activity assay by ristocetin cofactor. *Blood* 2010; **116**: 280-6.
- Vanhoorelbeke K, Pareyn I, Schlamadinger A, Vauterin S, Hoylaerts MF, Arnout J, Deckmyn H. Plasma glycosialicin as a source of GPIIb/IIIa in the von Willebrand factor ristocetin cofactor ELISA. *Thromb Haemost* 2005; **93**: 165-71.
- Federici AB, Canciani MT, Forza I, Mannucci PM, Marchese P, Ware J, Ruggeri ZM. A sensitive ristocetin co-factor activity assay with recombinant glycoprotein Iba for the diagnosis of patients with low von Willebrand factor levels. *Haematol* 2004; **89**: 77-85.
- Flood VH, Gill JC, Morateck PA, Christopherson PA, Friedman KD, Haberichter SL, Hoffmann RG, Montgomery RR. Gain-of-function GPIIb ELISA assay for VWF activity in the Zimmerman Program for the Molecular and Clinical Biology of VWD. *Blood* 2011; **117**: e67-e74
- Patzke J, Budde U, Huber A, Mendez A, Muth H, Obser T, Peerschke E, Wilkens M, Schneppenheim R. Performance evaluation and multicentre study of a von Willebrand factor activity assay based on GPIIb binding in the absence of ristocetin. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2014; **25**: 860-70.
- Geisen U, Zieger B, Nakamura L, Weis A, Heinz J, Michiels JJ, Heilmann C. Comparison of Von Willebrand factor (VWF) activity VWF:Ac with VWF ristocetin cofactor activity VWF:RCo. *Thromb Res* 2014; **134**: 246-50.
- Pinol M, Sales M, Costa M, Tosetto A, Canciani MT, Federici AB. Evaluation of a new turbidimetric assay for von Willebrand factor activity useful in the general screening of von Willebrand disease. *Haematologica* 2007; **92**: 712-3.
- Federici AB, Canciani MT. Clinical and laboratory versus molecular markers for a correct classification of von Willebrand disease. *Haematologica* 2009; **94**: 610-5.
- 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.

23. Flood VH, Schlauderer AC, Haberichter SL, Slobodianuk TL, Jacobi PM, Bellissimo DB, Christopherson PA, Friedman KD, Gill JC, Hoffmann RG, Montgomery RR. Crucial role for the VWF A1 domain in binding to type IV collagen. *Blood* 2015; **125**: 2297-304.
24. 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.
25. Favalaro EJ. Collagen binding assay for von Willebrand factor (vWF:CBA): detection of von Willebrand disease (vWD), and discrimination of vWD subtypes, depends on collagen source. *Thromb Haemost* 2000; **83**: 127-35.
26. Flood VH, Gill JC, Friedman KD, Christopherson PA, Jacobi PM, Hoffmann RG, Montgomery RR, Haberichter SL. Collagen binding provides a sensitive screen for variant von Willebrand disease. *Clin Chem* 2013; **59**: 684-91.
27. Favalaro EJ. Utility of the von Willebrand factor collagen binding assay in the diagnosis of von Willebrand disease. *Am J Hematol* 2017; **92**: 114-8.
28. 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.
29. 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.
30. Ruggeri ZM, Pareti FI, Mannucci PM, Ciavarella N, Zimmerman TS. Heightened interaction between platelets and factor VIII/von Willebrand factor in a new subtype of von Willebrand's disease. *N Engl J Med* 1980; **302**: 1047-51.
31. Scott JP, Montgomery RR. The rapid differentiation of type IIb von Willebrand's disease from platelet-type (pseudo-) von Willebrand's disease by the "neutral" monoclonal antibody binding assay. *Am J Clin Pathol* 1991; **96**: 723-8.
32. Caron C, Hilbert L, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H, Goudemand J, Mazurier C. Measurement of von Willebrand factor binding to a recombinant fragment of glycoprotein Ibalpha in an enzyme-linked immunosorbent assay-based method: performances in patients with type 2B von Willebrand disease. *Br J Haematol* 2006; **133**: 655-63.
33. Stufano F, Baronciani L, Pagliari MT, Franchi F, Cozzi G, Garcia-Oya I, Bucciarelli P, Boscarino M, Peyvandi F. Evaluation of an heterogeneous group of patients with von Willebrand disease using an assay alternative to ristocetin induced platelet agglutination. *J Thromb Haemost* 2015; **13**: 1806-14.
34. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JCJ, Favalaro EJ, Hill FGH, 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. 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.
35. Favalaro EJ, Patterson D, Denholm A, Mead S, Gilbert A, Collins A, Estell J, George PM, Smith MP. Differential identification of a rare form of platelet-type (pseudo-) von Willebrand disease (VWD) from Type 2B VWD using a simplified ristocetin-induced-platelet-agglutination mixing assay and confirmed by genetic analysis. *Br J Haematol* 2007; **139**: 623-6.
36. Sporn LA, Chavin SI, Marder VJ, Wagner DD. Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. *J Clin Invest* 1985; **76**: 1102-6.
37. Ott HW, Griesmacher A, Schnapka-Koepf M, Golderer G, Sieberer A, Spannagl M, Scheibe B, Perkhofer S, Will K, Budde U. Analysis of von Willebrand factor multimers by simultaneous high- and low-resolution vertical SDS-agarose gel electrophoresis and Cy5-labeled antibody high-sensitivity fluorescence detection. *Am J Clin Pathol* 2010; **133**: 322-30.
38. Nishino M, Girma JP, Rothschild C, Fressinaud E, Meyer D. New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII. *Blood* 1989; **74**: 1591-9.
39. Moake JL, Turner NA, Stathopoulos NA, Nolasco L, Hellums JD. Shear-induced platelet aggregation can be mediated by vWF released from platelets, as well as by exogenous large or unusually large vWF multimers, requires adenosine diphosphate, and is resistant to aspirin. *Blood* 1988; **71**: 1366-74.
40. Mannucci PM, Lombardi R, Bader R, Vianello L, Federici AB, Solinas S, Mazzucconi MG, Mariani G. Heterogeneity of Type I von Willebrand Disease: Evidence for a Subgroup with an Abnormal von Willebrand Factor. *Blood* 1985; **66**: 796-802.
41. Kaufmann JE, Vischer UM. Cellular mechanisms of the hemostatic effects of desmopressin (DDAVP). *J Thromb Haemost* 2003; **1**: 682-9.
42. Federici AB. The use of desmopressin in von Willebrand disease: the experience of the first 30 years (1977-2007). *Haemophilia* 2008; **14 Suppl 1**: 5-14.
43. Castaman G, Lethagen S, Federici AB, Tassetto A, Goodeve A, Budde U, Battle J, Meyer D, Mazurier C, Fressinaud E, Goudemand J, Eikenboom J, Schneppenheim R, Ingerslev J, Vorlova Z, Habart D, Holmberg L, Pasi J, Hill F, Peake I, Rodeghiero F. Response to desmopressin is influenced by the genotype

- and phenotype in type 1 von Willebrand disease (VWD): results from the European Study MCMDM-1VWD. *Blood* 2008; **111**: 3531-9.
44. Haberichter SL, Balistreri M, Christopherson P, Morateck P, Gavazova S, Bellissimo DB, Manco-Johnson MJ, Gill JC, Montgomery RR. Assay of the von Willebrand factor (VWF) propeptide to identify patients with type 1 von Willebrand disease with decreased VWF survival. *Blood* 2006; **108**: 3344-51.
 45. Schooten CJ, Tjernberg P, Westein E, Terraube V, Castaman G, Mourik JA, Hollestelle MJ, Vos HL, Bertina RM, Berg HM, Eikenboom JC, Lenting PJ, Denis CV. Cysteine-mutations in von Willebrand factor associated with increased clearance. *J Thromb Haemost* 2005; **3**: 2228-37.
 46. Habe K, Wada H, Ito-Habe N, Hatada T, Matsumoto T, Ohishi K, Maruyama K, Imai H, Mizutani H, Nobori T. Plasma ADAMTS13, von Willebrand factor (VWF) and VWF propeptide profiles in patients with DIC and related diseases. *Thromb Res* 2012; **129**: 598-602.
 47. Casonato A, Daidone V, Padrini R. Assessment of von Willebrand factor propeptide improves the diagnosis of von Willebrand disease. *Semin Thromb Hemost* 2011; **37**: 456-63.
 48. Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ, Marks WJ, Jr., Montgomery RR. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood* 1987; **69**: 1691-5.
 49. Nitu-Whalley IC, Lee CA, Griffioen A, Jenkins PV, Pasi KJ. Type 1 von Willebrand disease - a clinical retrospective study of the diagnosis, the influence of the ABO blood group and the role of the bleeding history. *Br J Haematol* 2000; **108**: 259-64.
 50. Sanders YV, Giezenaar MA, Laros-van Gorkom BA, Meijer K, van der Bom JG, Cnossen MH, Nijziel MR, Ypma PF, Fijnvandraat K, Eikenboom J, Mauser-Bunschoten EP, Leebeek FW. von Willebrand disease and aging: an evolving phenotype. *J Thromb Haemost* 2014; **12**: 1066-75.
 51. Magnette A, Chatelain M, Chatelain B, ten Cate H, Mullier F. Pre-analytical issues in the haemostasis laboratory: guidance for the clinical laboratories. *Thromb J* 2016; **14**:49.: 49-0123.
 52. Favalaro EJ, Nair SC, Forsyth CJ. Collection and transport of samples for laboratory testing in von Willebrand's disease (VWD): time for a reappraisal? *Thromb Haemost* 2001; **86**: 1589-90.
 53. Favalaro EJ, Soltani S, McDonald J. Potential laboratory misdiagnosis of hemophilia and von Willebrand disorder owing to cold activation of blood samples for testing. *Am J Clin Pathol* 2004; **122**: 686-92.
 54. Sadler JE. A revised classification of von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 1994; **71**: 520-5.
 55. Goodeve A, Eikenboom J, Castaman G, Rodeghiero F, Federici AB, Batlle J, Meyer D, Mazurier C, Goudemand J, Schneppenheim R, Budde U, Ingerslev J, Habart D, Vorlova Z, Holmberg L, Lethagen S, Pasi J, Hill F, Hashemi SM, Baronciani L, Hallden C, Guilliatt A, Lester W, Peake I. Phenotype and genotype of a cohort of families historically diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 von Willebrand Disease (MCMDM-1VWD). *Blood* 2007; **109**: 112-21.
 56. Favalaro EJ. Appropriate laboratory assessment as a critical facet in the proper diagnosis and classification of von Willebrand disorder. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; **14**: 299-319.
 57. Lyons SE, Cooney KA, Bockenstedt P, Ginsburg D. Characterization of Leu777Pro and Ile865Thr type IIA von Willebrand disease mutations. *Blood* 1994; **83**: 1551-7.
 58. Zimmerman TS, Dent JA, Ruggeri ZM, Nannini LH. Subunit composition of plasma von Willebrand factor. 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**: 947-51.
 59. Schneppenheim R, Brassard J, Krey S, Budde U, Kunicki TJ, Holmberg L, Ware J, Ruggeri ZM. Defective dimerization of the von Willebrand factor subunits due to a Cys->Arg mutation in type IID von Willebrand disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 3581-6.
 60. Federici AB, Mannucci PM, Castaman G, Baronciani L, Bucciarelli P, Canciani MT, Pecci A, Lenting PJ, de Groot PG. Clinical and molecular predictors of thrombocytopenia and risk of bleeding in patients with von Willebrand disease type 2B: a cohort study of 67 patients. *Blood* 2009; **113**: 526-34.
 61. Nishio K, Anderson PJ, Zheng XL, Sadler JE. Binding of platelet glycoprotein Iba to von Willebrand factor domain A1 stimulates the cleavage of the adjacent domain A2 by ADAMTS13. *Proc Natl Acad Sci* 2004; **101**: 10578-83.
 62. Weiss HJ, Meyer D, Rabinowitz R, Pietu G, Girma JP, Vicic WJ, Rogers J. Pseudo-von Willebrand's disease. An intrinsic platelet defect with aggregation by unmodified human factor VIII/von Willebrand factor and enhanced adsorption of its high-molecular-weight multimers. *N Engl J Med* 1982; **306**: 326-33.
 63. Miller JL, Castella A. Platelet-type von Willebrand's disease: characterization of a new bleeding disorder. *Blood* 1982; **60**: 790-4.
 64. Othman M, Kaur H, Emsley J. Platelet-type von Willebrand disease: new insights into the molecular pathophysiology of a unique platelet defect. *Semin Thromb Hemost* 2013; **39**: 663-73.

65. Meyer D, Fressinaud E, Hilbert L, Ribba AS, Lavergne JM, Mazurier C. Type 2 von Willebrand disease causing defective von Willebrand factor-dependent platelet function. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; **14**: 349-64.
66. Mannucci PM, Bloom AL, Larrieu MJ, Nilsson IM, West RR. Atherosclerosis and von Willebrand factor. I. Prevalence of severe von Willebrand's disease in western Europe and Israel. *Br J Haematol* 1984; **57**: 163-9.
67. Baronciani L, Cozzi G, Canciani MT, Peyvandi F, Srivastava A, Federici AB, Mannucci PM. Molecular defects in type 3 von Willebrand disease: updated results from 40 multiethnic patients. *Blood Cells, Mol & Dis* 2003; **30**: 264-70.
68. Mannucci PM, Lattuada A, Castaman G, Lombardi R, Colibretti ML, Ciavarella N, Rodeghiero F. Heterogeneous phenotypes of platelet and plasma von Willebrand factor in obligatory heterozygotes for severe von Willebrand disease. *Blood* 1989; **74**: 2433-6.
69. Barbui T, Baudo F, Ciavarella N, Mariani G, Capitanio A, Mannucci PM, Pareti FI, Ruggeri ZM, (Italian Working Group). Spectrum of von Willebrand's disease: a study of 100 cases. *Br J Haematol* 1977; **35**: 101-12.
70. Federici AB, Rand JH, Bucciarelli P, Budde U, van Genderen PJJ, Mohri H, Meyer D, Rodeghiero F, Sadler JE. Acquired von Willebrand Syndrome: data from an International Registry. *Thromb Haemost* 2000; **84**: 345-9.
71. Veyradier A, Jenkins CS, Freissinaud E, Meyer D. Acquired von Willebrand Syndrome: from Pathophysiology to Management. *Thromb Haemost* 2000; **84**: 175-82.
72. Mannucci PM, Lombardi R, Bader R, Horellou MH, Finazzi G, Besana C, Conard J, Samama M. Studies of the Pathophysiology of Acquired von Willebrand Disease in Seven Patients with Lymphoproliferative Disorders or Benign Monoclonal Gammopathies. *Blood* 1984; **64**: 614-21.
73. Mannucci PM, Federici AB. Antibodies to von Willebrand factor in von Willebrand disease. *Adv Exp Med Biol* 1995; **386**: 87-92.
74. Iorio A, Oliovocchio E, Morfini M, Mannucci PM. Italian Registry of Haemophilia and Allied Disorders. Objectives, methodology and data analysis. *Haemophilia* 2008; **14**: 444-53.
75. James PD, Lillicrap D, Mannucci PM. Alloantibodies in von Willebrand disease. *Blood* 2013; **122**: 636-40.
76. Fricke WA, Brinkhous KM, Garris JB, Roberts HR. Comparison of inhibitory and binding characteristics of an antibody causing acquired von Willebrand syndrome: an assay for von Willebrand factor binding by antibody. *Blood* 1985; **66**: 562-9.
77. Mohri H, Tanabe J, Ohtsuka M, Yoshida M, Motomura S, Nishida S, Fujimura Y, Okubo T. Acquired von Willebrand disease associated with multiple myeloma; characterization of an inhibitor to von Willebrand factor. *Bl Coag Fibrin* 1995; **6**: 561-6.
78. van Genderen PJJ, Vink T, Michiels JJ, van't Veer MB, Sixma JJ, van Vliet HHD. Acquired von Willebrand disease caused by an autoantibody selectively inhibiting the binding of von Willebrand factor to collagen. *Blood* 1994; **84**: 3378-84.
79. Guerin V, Ryman A, Velez F. Acquired von Willebrand disease: potential contribution of the von Willebrand factor collagen-binding to the identification of functionally inhibiting auto-antibodies to von Willebrand factor: a rebuttal. *J Thromb Haemost* 2008; **6**: 1051-2.
80. Berntorp E, Peake I, Budde U, Laffan M, Montgomery R, Windyga J, Goodeve A, Petrini P, von Depka M, Miesbach W, Lillicrap D, Federici AB, Lassila R, White G. von Willebrand's disease: a report from a meeting in the Aland islands. *Haemophilia* 2012; **18**: 1-13.
81. Tiede A, Priesack J, Werwitzke S, Bohlmann K, Oortwijn B, Lenting P, Eisert R, Ganser A, Budde U. Diagnostic workup of patients with acquired von Willebrand syndrome: a retrospective single-centre cohort study. *J Thromb Haemost* 2008; **6**: 569-76.
82. Mohri H, Motomura S, Kanamori H, Matsuzaki M, Watanabe S, Maruta A, Kodama F, Okubo T. Clinical significance of inhibitors in acquired von Willebrand syndrome. *Blood* 1998; **91**: 3623-9.
83. Siaka C, Rugeri L, Caron C, Goudemand J. A new ELISA assay for diagnosis of acquired von Willebrand syndrome. *Haemophilia* 2003; **9**: 303-8.
84. Franchi F, Biguzzi E, Stufano F, Siboni SM, Baronciani L, Peyvandi F. A two-step approach (Enzyme-linked immunosorbent assay and confirmation assay) to detect antibodies against von Willebrand factor in patients with Acquired von Willebrand Syndrome. *Thromb Res* 2014; **134**: 1316-22.
85. Kasper CK. von Willebrand disease. The CSL Behring foundation for research and advancement of patient health, 2008; pp. 1-53.

