

Enfermedad de von Willebrand. Novedades en diagnóstico de laboratorio

Von Willebrand disease.
What's new in laboratory diagnosis?

Blanco AN

*División Hemostasia, Depto. Hemostasia y Trombosis, IIHEMA,
Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina*

blanco@hematologia.anm.edu.ar



SIMPOSIO SAH - CAHT:
ENFERMEDAD DE
VON WILLEBRAND

HEMATOLOGÍA
Volumen 22 • Número Extraordinario
XIII Congreso del Grupo CAHT: 54-64
Septiembre 2018

Palabras claves: factor von Willebrand,
enfermedad de von Willebrand,
diagnóstico.

Keywords: von Willebrand factor,
von Willebrand disease,
diagnosis.

La enfermedad de von Willebrand (VWD) se caracteriza por sangrado mucocutáneo o sangrado post-cirugía o trauma, con alteración de la adhesión y agregación de las plaquetas, así como de la estabilización y transporte del factor VIII (FVIII). Es debida a la deficiencia y/o defecto del factor von Willebrand (VWF), glicoproteína multimérica producida en las células endoteliales y en los megacariocitos, que circula en el plasma unida al FVIII⁽¹⁻⁴⁾.

Factor von Willebrand (VWF)

El VWF tiene un rol esencial tanto en la hemostasia primaria como en la secundaria.

A través de la interacción de sus dominios funcionales con proteínas de la pared vascular como el co-

lágono, el FVIII de la coagulación y los receptores plaquetarios glicoproteínas Ib α (GPIb α) y IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) contribuye a la unión de las plaquetas al subendotelio, a la interacción plaqueta-plaqueta, como así también a la protección y localización del FVIII en los sitios de daño vascular⁽³⁾. El VWF se halla, además, involucrado en otros procesos como la inflamación y la angiogénesis.

El gen *VWF* está localizado en el cromosoma 12 (12p13.2)^(2,3). Tiene 52 exones que codifican una proteína de 2813 aminoácidos compuesta por el péptido señal (prepéptido), el propéptido (VWFpp) y la subunidad madura. La proteína se compone de varios dominios (D1, D2, D', D3, A1, A2, A3, D4, C1-C6, CK), responsables de la diferente capa-

cidad de unión de la molécula. El VWF circulante está compuesto por multímeros de peso molecular entre 500 a 20.000 kDa, producto de un complejo proceso que involucra dimerización (C-terminal), multimerización (N-terminal), escisión del VWFpp (N-terminal) y modificación post-traduccional por glicosilación y sulfatación ligada a N- y O⁽¹⁻³⁾. Los multímetros, transportados y almacenados en los cuerpos de Weibel-Palade (WPB) de la células endoteliales o en los gránulos α de la plaquetas⁽³⁾, se secretan en forma constitutiva o se almacenan para su liberación frente al desafío hemostático⁽²⁾. VWF y VWFpp se secretan en una proporción de 1:1^(2,3). En el plasma, la acción de la metaloproteinasa ADAMTS13 sobre el dominio A2 del VWF reduce el tamaño de los multímeros y su función hemostática^(1,3); las formas multiméricas ultra grandes (UL-VWF) pueden interactuar espontáneamente con las plaquetas. En condiciones normales (baja fuerza de cizallamiento) el VWF exhibe muy baja afinidad por las plaquetas; cuando se expone el colágeno subendotelial por una lesión, el VWF se une a él a través del dominio A3 y el incremento de la fuerza de cizallamiento induce un cambio de forma (globular-desplegado) que revela el sitio de unión a la GPIIb α en

el dominio A1⁽³⁾. El proceso de depuración del VWF involucra diferentes receptores celulares según las características moleculares del VWF. Variantes en la secuencia del gen *VWF* interrumpen o afectan uno o más de los pasos del proceso de biosíntesis⁽²⁾ y dan lugar a variantes de la VWD.

Los conocimientos actuales sobre los aspectos funcionales y estructurales del VWF, así como su biosíntesis y regulación genética, junto al desarrollo de nuevas metodologías de estudio abre un nuevo panorama en la identificación, caracterización y clasificación de la VWD, con su consecuente efecto sobre el manejo terapéutico.

Enfermedad de von Willebrand (VWD)

La VWD es el defecto hemorrágico congénito más frecuente⁽¹⁻⁴⁾. El patrón de herencia es autosómico, en general dominante, aunque hay casos recesivos^(1,2). Además de los defectos congénitos hay trastornos adquiridos, no siempre correctamente diagnosticados. La prevalencia del síndrome de von Willebrand adquirido (AVWS) está en aumento⁽⁵⁾. Los mecanismos fisiopatológicos son diversos (depuración aumentada, inhibición, degradación, adsorción)⁽⁵⁾.

Tabla 1. Tipos, mecanismos, herencia y genética de la enfermedad de von Willebrand

Tipo	Mecanismo	Herencia	Genética
1	Deficiencia parcial de VWF (60-70% de los casos)	Autosómica dominante	Cambio de sentido (85-90%). Alelo nulo (10-15%). Oligogénico. Penetrancia y expresión variable
2	Deficiencia cualitativa (25-30% de los casos)	Autosómica dominante. Autosómica recesiva	
2A	Disminución de la adhesión a plaquetas (GPIIb) por disminución selectiva de HMWM e IMWM	Autosómica dominante. Autosómica recesiva	Cambio de sentido principalmente: D2, D3, A2 y CK Cambio de sentido: región VWFpp
2B	Disminución de la afinidad VWF \leftrightarrow GPIIb	Autosómica dominante	Cambio de sentido: A1
2M	Disminución de la adhesión a plaquetas sin disminución selectiva de HMWM	Autosómica dominante	Cambio de sentido: A1
2N	Disminución de la afinidad VWF \leftrightarrow FVIII	Autosómica recesiva	Cambio de sentido: D' y D3
3	Virtual deficiencia completa de VWF (1-2% de los casos)	Autosómica recesiva. Codominante	Principalmente alelo nulo; cambio de sentido, cambio sin sentido, inserciones, deleciones grandes-pequeñas; frecuente consanguinidad

FVIII: factor VIII; GPIIb α : glicoproteína Ib alfa; HMWM: multímeros de alto peso molecular; IMWM: multímeros de peso molecular intermedio; VWF: factor von Willebrand; VWFpp: propéptido de factor von Willebrand.

Clasificación

La VWD es un trastorno heterogéneo. En base a las características fenotípicas se describen diferentes tipos según se trate de una deficiencia cuantitativa parcial (tipo 1) o total (tipo 3), o bien de diferentes defectos cualitativos (tipos 2A, 2B, 2M, 2N)⁽¹⁻³⁾. El VWD tipo 1 es el más frecuente (70-80% de los casos), en tanto que el VWD tipo 3, la forma más severa de la enfermedad, es un defecto raro (<5% de los casos)^(1-4,6).

La **tabla 1** resume características del mecanismo fisiopatológico, modo de herencia y alteraciones genéticas asociadas a los diferentes tipos de VWD, para facilitar su comprensión y clasificación.

En el VWD tipo 3 no se detecta proteína circulante o sus niveles son muy bajos (<1-5 UI/dL)⁽¹⁻³⁾, lo mismo ocurre con el VWFpp. El fenotipo es heterogéneo; puede observarse producción nula de VWF, así como defectos cualitativos o cuantitativos en la formación de los WPB⁽²⁾. Se hereda de forma recesiva o codominante (homocigotos o heterocigotos compuestos para dos alelos nulos del *VWF*)^(1,2). La codominancia se observa en aproximadamente 50% de los casos; los portadores heterocigotos presentan un fenotipo tipo 1 leve^(1,2). El 5-10% de los VWD tipo 3 puede desarrollar anticuerpos anti-VWF (neutralizantes o no) en respuesta a la terapéutica de reemplazo, lo cual complica aún más el tratamiento⁽⁷⁾. En los VWD tipo 2, el fenotipo generalmente es penetrante y está determinado por defectos en aspectos funcionales particulares de la molécula del VWF⁽¹⁻³⁾. El VWD tipo 2A se caracteriza por alteración en la unión a la GPIb α y alteración del patrón multimérico⁽¹⁻³⁾. Es el más común de los defectos cualitativos; la mayoría de las variantes afectan el procesamiento del VWF, algunas de ellas son difíciles de clasificar al afectar varios aspectos superpuestos de la compleja biosíntesis del VWF⁽²⁾. En la mayoría de las variantes (80%) la alteración se encuentra en el dominio A2 del VWF (exón 28), cerca del sitio de clivaje de ADAMTS13, y en A1, provocando mayor susceptibilidad al ataque por ADAMTS13 y/o retención intracelular⁽¹⁻³⁾. Otras sustituciones se hallan en los dominios D2 (VWFpp) y D'D3, ambas regiones involucradas en la multimerización del VWF (10%), así como en el dominio C-K, que regula la dimerización (10%)⁽¹⁻³⁾.

El VWD tipo 2B presenta moléculas de VWF con aumento de la capacidad (ganancia de función) de unión a la GPIb α ^(1-3,8). Se observa pérdida de multi-

meros de alto peso molecular (HMWM) y trombocitopenia crónica^(1-3,8). Los síntomas hemorrágicos pueden verse agravados por situaciones que aumenten los niveles plasmáticos de VWF, incluyendo inflamación, traumatismo o embarazo⁽²⁾. Las variantes se localizan exclusivamente en el dominio A1 (exón 28)⁽²⁾. El diagnóstico genético molecular es importante para distinguirlo de su fenocopia, el VWD tipo plaquetario (PT-VWD), debido a variantes en la secuencia del gen *GPIBA* que provocan aumento de la capacidad de unión al VWF^(2,9). Recientemente se ha descrito presencia de inhibidor anti-VWF en un paciente tipo 2B.

El VWD tipo 2M se caracteriza por menor capacidad de unión del VWF, ya sea a la GPIb α (defecto en el dominio A1) o al colágeno (defecto en los dominios A1 y A3), sin alteración significativa del patrón multimérico⁽¹⁻³⁾. Las variantes pueden mostrar diferencias en su interacción con los distintos tipos de colágeno (I, III, IV y VI)⁽²⁾.

El VWD tipo 2N implica alteración de la capacidad de unión del VWF al FVIII y proteólisis acelerada de este último. Se caracteriza por niveles normales del antígeno y de la actividad del VWF, pero bajos de la actividad coagulante del FVIII (5-40 UI/dL); con frecuencia se diagnostica erróneamente como hemofilia A leve⁽²⁾. El genotipo puede ser homocigoto o heterocigoto compuesto (dos alelos 2N diferentes o un alelo 2N y un alelo nulo)⁽²⁾. Las variantes de la secuencia del *VWF* se localizan en la región que corresponde a D'D3; las formas severas, en particular, corresponden a defectos en el *loop* flexible de la región D'⁽²⁾.

El VWD tipo 1 es la forma más prevalente, representando hasta el 80% de todos los casos^(1-4,6). No existe consenso sobre el fenotipo, si bien se define en general como una deficiencia cuantitativa leve o moderada, con niveles de VWF en plasma entre 5 y 50 UI/dL. Niveles inferiores a 30 UI/dL serían diagnósticos, ya que están fuertemente asociados a severidad clínica y presencia de mutaciones en el gen *VWF*⁽³⁾. En tanto pacientes con fenotipo hemorrágico y niveles entre 30-50 UI/dL deberían considerarse como "posible VWD tipo 1" o individuos con "bajo VWF"⁽¹⁻³⁾. Sólo en aproximadamente 30-35% de los pacientes con VWD tipo 1 se han detectado alteraciones en la secuencia del gen *VWF*, que pueden afectar cualquiera de los dominios del VWF⁽²⁾. Son defectos cuantitativos debidos a alelos nulos o

en la mayoría de los casos, consecuencia de cambios en la estructura primaria del VWF^(1,2). Las variantes pueden llevar a una alteración de la síntesis por cambios en el promotor, retención intracelular (en la mayoría de los casos) y también defecto en la depuración del VWF^(1,2). Las variantes que afectan la secreción suelen asociarse a cambios en los dominios D1, D2 y D3 del VWF; aquéllas correspondientes a depuración acelerada (tipo 1C) son menos frecuentes (15-20% de los casos) y afectan predominantemente los dominios D3, A1 y D4 del VWF⁽²⁾. Las variantes que implican un cambio de sentido (mutaciones con sentido equivocado), ejercen un efecto dominante negativo sobre el alelo normal, lo cual lleva a un fenotipo más severo que el observado en individuos heterocigotos de alelos nulos⁽¹⁾.

Variabilidad y controversias

Los niveles de VWF plasmáticos varían ampliamente. Hoy sabemos que hay modificadores genéticos, fuera del *VWF*, y factores fisiológicos que pueden jugar un papel en esta variabilidad. Los niveles de VWF están significativamente influenciados por variables fisiológicas (edad, ejercicio, ciclo menstrual, embarazo) o patológicas (inflamación, cáncer) y también por variables genéticas como la raza y el grupo sanguíneo ABO, uno de los principales responsables de la variabilidad genética⁽¹⁻⁶⁾; los niveles de VWF en individuos tipo "0" son 25%-35% más bajos que en los tipo "no-0"^(1-4,6).

En general se acepta como rango de referencia 50-150 UI/dL, pero existe discusión respecto a los valores de corte sugeridos para el diagnóstico o el tratamiento^(1,10). Esto es particularmente crítico en el caso del VWD tipo 1. Cuanto más bajo sea el valor de corte, más consistente será el fenotipo hemorrágico, el patrón hereditario y la identificación de variantes de la secuencia del *VWF*^(1,3). Valores de VWF <30 UI/dL podrían ser considerados diagnósticos; valores entre 30-50 UI/dL en individuos con tendencia hemorrágica podrían ser considerados como "VWF bajo" o interpretados como "posible VWD tipo 1". Hay controversias porque no todos los casos con disminución de VWF presentan sangrados clínicamente relevantes e individuos con fenotipo "posible VWD tipo 1" podrían requerir tratamiento previo a cirugía o frente a un episodio hemorrágico⁽¹⁾. Un nivel bajo de VWF podría ser considerado como indicador de mayor riesgo de sangrado⁽¹⁾. Algunos

VWD tipo 1 presentan variantes en la secuencia del *VWF*, mientras que en otros el nivel de VWF estaría determinado por otros loci genéticos⁽¹⁾. También es factible que pudieran contribuir al fenotipo hemorrágico otros defectos hemostáticos, como los trastornos leves de la función plaquetaria⁽¹⁾.

Otro dilema surge por el aumento fisiológico del VWF con la edad, a una tasa aproximada de 0,8% por año⁽¹⁻³⁾. Niveles fisiológicamente más bajos en la infancia podrían interpretarse erróneamente como indicativos de VWD; los valores de VWF en adultos mayores, con criterios de VWD tipo 1 en la juventud, pueden normalizarse, pero a pesar de ello presentar riesgo hemorrágico⁽²⁾.

Diagnóstico

El diagnóstico correcto es complejo y no siempre sencillo. Las dificultades están relacionadas con la variabilidad del fenotipo hemorrágico, la variación de los niveles de VWF y la compleja clasificación de la enfermedad en una amplia gama de tipos y subtipos. El enfoque diagnóstico se basa en dos aspectos principales: la evaluación de la historia hemorrágica (personal o familiar), a fin de estimar el fenotipo clínico y las pruebas de laboratorio para evidenciar la deficiencia y/o las anomalías del VWF, del FVIII o ambos^(1,5).

Para abordar el diagnóstico es preciso tener presente que se trata de un trastorno heterogéneo, reflejo de la compleja estructura y biosíntesis del VWF e influenciado por factores adicionales, genéticos (no debidos al gen *VWF*) y no-genéticos, que determinan la expresión fenotípica clínica y de laboratorio^(1-4,6,11). Los individuos afectados presentan niveles disminuidos de una o varias de las funciones del VWF. A la heterogeneidad se suman las dificultades para estandarizar las pruebas diagnósticas. Además, no siempre coexisten la historia de sangrado y la detección de la disminución o alteración del VWF, hay superposición del fenotipo (clínico/laboratorio) de VWD con el fenotipo "sano" y no hay consenso en los valores de corte para las diferentes pruebas. Esto plantea el problema tanto del subdiagnóstico como del sobrediagnóstico^(1,3).

Valoración de los antecedentes personales o familiares de sangrado

Es el primer paso a considerar para indicar la evaluación de laboratorio. Un historial hemorrágico posi-

tivo es altamente específico (>95%) aunque menos sensible (50%-60%) a la presencia de VWD⁽³⁾. El interrogatorio médico es fundamental; la gravedad de un trastorno hemorrágico puede juzgarse a partir de la edad de inicio, de su naturaleza traumática, de su frecuencia, de la multiplicidad de los sitios de sangrado y/o del requerimiento transfusional^(2,4-6). Se han postulado diferentes sistemas de valoración de los síntomas mediante cuestionarios estructurados y sistemas de puntuación^(1,5); entre ellos cabe mencionar el cuestionario ISTH-BAT (*International Society on Thrombosis and Haemostasis Bleeding Assessment Tool*) (<https://bh.rockefeller.edu/ISTH-BATR/>), aprobado por la Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis^(1,3). Estas herramientas permiten la comparación cuantitativa de la gravedad de la tendencia hemorrágica^(3,5), pero tienen limitaciones, dependen de la edad y del número de desafíos hemostáticos previos, son poco específicas y carecen de información sobre la frecuencia de la hemorragia^(3,5).

Pruebas diagnósticas

El otro aspecto diagnóstico es la caracterización del fenotipo a través de una investigación de laboratorio apropiada para evidenciar la deficiencia y/o las anomalías del VWF, del FVIII o de ambos^(1-4,6,11).

Hay diferentes pruebas para detectar la presencia del VWF y/o productos de su síntesis, evidenciar características estructurales de la molécula, así como evaluar su función pleiotrópica, permitiendo la clasificación del defecto en sus diferentes tipos^(1-4,6,11). La **tabla 2** resume el nombre y la abreviatura de las pruebas más significativas, así como su utilidad aplicada al diagnóstico del VWD⁽¹⁻³⁾. En la práctica, el diagnóstico se basa en la detección de la disminución de la actividad del VWF, ya sea su capacidad de unión a GPIb α o a colágeno, seguida de la caracterización adicional del tipo de VWD⁽¹¹⁾. Para ello se requieren ensayos adicionales, además de la estimación de la proteína y del FVIII^(1,3,5,12).

Tabla 2. Utilidad de las pruebas para evaluar el fenotipo de laboratorio

Pruebas básicas	
VWF:Ag	Mide la concentración de la proteína (VWF)
VWF:RCo	Prueba funcional; evalúa unión a la GPIb α
VWF:Actividad (PD-VWFact)	Pruebas funcionales que evalúan unión a la GPIb α - VWF:GPIbR interacción VWF \leftrightarrow GPIb α en presencia de ristocetina - VWF:GPIbM interacción VWF \leftrightarrow GPIb α mutada (sin ristocetina) - VWF:Ab anticuerpos que detectan la región del VWF que se une a la GPIb α (epitope que une GPIb)
FVIII:C	Mide la actividad coagulante Útil en el manejo clínico en general
Pruebas complementarias	
RIPA <small>bajas dosis</small>	Detecta hiper-respuesta a ristocetina (ganancia de función)
Análisis multimérico	Analiza el patrón multimérico, reflejo de la estructura molecular
VWF:FVIIIIB	Evalúa la capacidad del VWF de unir FVIII
VWF:CB	Evalúa unión al colágeno; depende del tipo de colágeno (I, III, IV, VI)
VWFpp	Mide la concentración del propéptido, refleja la síntesis de VWF

VWF:Ag: antígeno de factor von Willebrand; VWF:RCo: actividad de cofactor de ristocetina; (PD-VWFact): pruebas de funcionalidad respecto a la capacidad del factor von Willebrand de interactuar con la glicoproteína Ib alfa (GPIb α); VWF:GPIbR: capacidad de unión a GPIb α ("normal-variante natural") inducida por ristocetina; VWF:GPIbM: capacidad de unión espontánea a GPIb α mutante (ganancia de función); VWF:Ab: detección del sitio de unión a GPIb α (epitope dominio A1) mediante un anticuerpo monoclonal; FVIII:C: actividad coagulante del factor VIII; RIPA: agregación inducida con ristocetina; VWF:FVIIIIB: unión al FVIII; VWF:CB: unión al colágeno; VWFpp: propéptido del factor von Willebrand.

Discutiremos la interpretación y utilidad de los elementos diagnósticos disponibles para caracterizar fenotípicamente y genotípicamente a los individuos con VWD, teniendo en consideración las nuevas metodologías o nuevos enfoques diagnósticos. Los estudios pueden dividirse en pruebas de evaluación inicial, básicas o de primer nivel y complementarias o de segundo nivel; veremos su contribución al diagnóstico y clasificación del VWD.

Pruebas de evaluación inicial

Incluyen las pruebas de hemostasia primaria [recuento de plaquetas, tiempo de sangría (TS), analizador de la función plaquetaria (PFA-100/200)] y secundaria [tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA), tiempo de protrombina (TP), tiempo de trombina (TT)]. Tienen escasa importancia en el diagnóstico de VWD. Si bien el TS y el PFA-100/200 podrían dar alterados por el defecto de adhesión y agregación de plaquetas o el TTPA por la disminución de FVIII, la obtención de resultados normales de estas pruebas no permiten descartar un defecto a nivel del VWF; es decir, sólo sirven para alertar sobre un posible defecto en caso de dar alteradas. El TP y el TT no se modifican por defectos del VWF, pero siempre es conveniente incluirlos en un estudio inicial a fin de evidenciar alguna otra posible alteración.

- El recuento de plaquetas suele ser normal en la mayoría de los casos de VWD; sólo puede observarse trombocitopenia leve a moderada en el VWD tipo 2B⁽⁸⁾.
- El TS tiene una correlación relativa con el nivel de VWF en VWD tipo 1. Actualmente se sugiere no realizarlo⁽³⁾.
- El PFA-100/200 (Dade Behring, Marburg, Alemania) depende de la capacidad de unión del VWF a las plaquetas, pero un resultado normal no permite excluir formas leves de VWD^(5,13). La sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo para VWD son bajos, lo cual limita su utilidad como prueba de evaluación inicial⁽¹³⁾.
- El TTPA da prolongado sólo en los casos de VWD con disminución de los niveles de FVIII. Además, los resultados dependen de la sensibilidad de los sistemas equipo-reactivo a la disminución leve o moderada de FVIII⁽¹⁴⁾.

Pruebas diagnósticas básicas o de primer nivel

Incluyen la medición de la concentración plasmática del antígeno de VWF (VWF:Ag) y de su actividad (capacidad de unión del VWF a plaquetas), evaluada históricamente mediante el ensayo de actividad del cofactor de ristocetina (VWF:RCo), junto a la medición de la actividad coagulante del FVIII (FVIII:C)^(1,3-6,11,12). No se incluye en general en este grupo la determinación de la capacidad de unión de VWF al colágeno (VWF:CB), aunque existen diferentes criterios al respecto^(1,3,4,6,11).

- El VWF:Ag suele determinarse mediante ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) o inmunoensayos automatizados de aglutinación de partículas de látex (LIA)^(12,15). La correlación entre ambas metodologías es buena, con sensibilidad y especificidad semejantes. La prueba ELISA tiene un "límite inferior de detección" más bajo, lo cual facilita una mejor distinción entre los VWD tipos 1 y 3, pero su coeficiente de variación puede ser mayor^(3,12). El VWF posee gran variabilidad biológica, que resulta en un rango de referencia amplio⁽⁵⁾. No existe un nivel de corte inferior claramente definido que permita distinguir entre VWD, "posible VWD" o "VWF bajo", e individuos sanos; la interpretación depende del fenotipo clínico^(3,5).
- La actividad de VWF se mide mediante el ensayo de VWF:RCo, que refleja la capacidad del VWF de adherirse a plaquetas^(5,16). Si bien es la prueba de referencia, posee baja reproducibilidad, precisión y sensibilidad, en especial a valores bajos de VWF^(1,3,12). Recientemente se han desarrollado ensayos automatizados (mencionados en la **tabla 2**)⁽¹⁷⁾, los cuales reflejan la capacidad de unión del VWF a plaquetas con mayor precisión y sensibilidad que el VWF:RCo^(1,5,18). Estos ensayos utilizan fragmentos de GPIIb/IIIa recombinante en lugar de plaquetas^(5,17). En algunos ensayos se utiliza ristocetina para desencadenar la unión VWF-GPIIb/IIIa (indicada como VWF:GPIIbR); en otros se emplea un fragmento de GPIIb/IIIa recombinante con ganancia de función, capaz de unir al VWF en ausencia de ristocetina (VWF:GPIIbM)^(5,17). También hay ensayos que emplean anticuerpos (VWF:Ab) capaces de detectar la región de la molécula del VWF que se une a la GPIIb/IIIa^(5,17). La nomenclatura sugerida para denominar los diferentes ensayos que evalúan la capacidad del

VWF de interactuar con la GPIb α es PD-VW-Fact⁽¹⁷⁾. Las nuevas metodologías, así como las modificaciones o adaptaciones a diferente instrumental, poseen buena reproducibilidad, sensibilidad y correlación con el VWF:RCo, pero todas ellas deben ser validadas en cada laboratorio, antes de ser aplicadas al uso clínico⁽¹⁸⁾. Es preciso tener presente que en algunas variantes de VWD puede haber discrepancias entre los resultados de las diferentes pruebas^(18,19). La sensibilidad para detectar alteraciones por disminución de HMWM es diferente en los distintos ensayos, siendo mayor para VWF:GPIbM y VWF:CB, intermedia para VWF:RCo y VWF:GPIbR y menor para VWF:Ab⁽²⁰⁾. A pesar de las diferencias observadas, la mayoría de estas pruebas serían capaces de diferenciar entre VWD tipo 1 y VWD tipo 2⁽²⁰⁾. Los nuevos ensayos automatizados, aplicando el principio de quimioluminiscencia, permiten obtener no sólo resultados más rápidos y reproducibles, sino que además combinan la detección de varios aspectos del VWF (VWF:Ag, VWF:RCo, VWF:CB) a la vez⁽²¹⁾. Sus resultados son comparables a los obtenidos aplicando otros principios. A su vez, el sistema de quimioluminiscencia muestra algunas ventajas: posee mejor nivel mínimo de sensibilidad y menor variabilidad inter-ensayo⁽²¹⁾.

Un estudio colaborativo reciente⁽¹⁹⁾, organizado por el Subcomité de VWF de la Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis (SSC-ISTH), compara los resultados de diferentes ensayos para evaluar la capacidad de unión de VWF a la GPI α . En él se observa que todos los ensayos evaluados tienen buena correlación con el VWF:RCo ($r:0.963-0.989$), sin diferencias clínicamente significativas, si bien, como fuera previamente observado, algunos pacientes se comportan de modo diferente en distintos ensayos, lo cual parecería depender de la prueba en sí misma⁽¹⁹⁾. Como se mencionó anteriormente, la sensibilidad del VWF:RCo es baja; en general su límite de detección es aproximadamente 10 UI/dL. Los nuevos ensayos poseen mayor sensibilidad, con valores de límite de detección entre 3-6 UI/dL para la mayoría de ellos; incluso, dos ensayos (VWF:GPIbM-ELISA "in house" y VWF:GPIbR-quimioluminiscencia) mostraron ser capaces de detectar actividad <1 UI/dL⁽¹⁹⁾.

Contar con una medida de la actividad de VWF más confiable, en el rango de concentraciones bajas, es importante para poder clasificar correctamente pacientes con VWD moderada a severa. Según lo esperado, los coeficientes de variación fueron mayores en los niveles de actividad patológicos que en los normales, mostrando en general los nuevos ensayos menor variación interlaboratorio⁽¹⁹⁾.

- El FVIII:C se determina por la técnica tradicional en una etapa o por la técnica amidolítica con sustratos cromogénicos⁽²²⁾.

La combinación de los resultados de VWF:Ag y de la actividad de VWF (capacidad de unión a plaquetas) permite clasificar los VWD tipo 1, 2 y 3^(1,3,11). En el VWD tipo 3 el VWF:Ag está (virtualmente) ausente, mientras que en el VWD tipo 1 se observa una disminución parcial del VWF:Ag, proporcional a la actividad VWF^(1-6,11,12). En el VWD tipo 2, que comprende los defectos funcionales del VWF, la relación entre la actividad de VWF y el VWF:Ag se halla disminuida (actividad de VWF/VWF:Ag<0,6)^(1-6,11,12). La medición de FVIII:C es importante para estimar su contribución al fenotipo hemorrágico, especialmente relevante en el VWD tipo 3^(1-6,11,12). Por otra parte, la disminución de FVIII:C en relación a la cantidad de VWF:Ag (FVIII:C/VWF:Ag<0,6) puede ser indicativo de VWD tipo 2N, caracterizado por una reducción de la capacidad del VWF de unir al FVIII^(1-6,11,12).

Ensayos complementarios o de segundo nivel

Si bien las pruebas básicas detectan la mayoría de los individuos con VWD, se requieren ensayos complementarios para identificar y clasificar los diferentes tipos y subtipos de VWD, lo cual importa para el manejo terapéutico^(1,5,11).

- La prueba de agregación plaquetaria inducida por ristocetina (RIPA) a bajas dosis permite evidenciar aquellos individuos con VWD tipo 2B, que muestran agregación a concentraciones de ristocetina por debajo de la concentración umbral (hiper-respuesta)^(12,23). Un aspecto crítico es la concentración de ristocetina utilizada⁽⁸⁾. Puede ser 0,5 mg/mL, teniendo presente que según las variantes la hiper-respuesta puede observarse a dosis más altas (P1266L) o más bajas (V1316M) (incluso 0,3 mg/mL). Los ensayos de mezcla con

- plasma o plaquetas del paciente y del normal, permiten revelar si la hiper-respuesta es debida a un componente plasmático o plaquetario, contribuyendo al diagnóstico diferencial entre VWD tipo 2B y PT-VWD^(8,9,23). Esto se complementa con el resultado de la agregación inducida por crioprecipitados, ausente en VWD tipo 2B y presente en PT-VWD, más allá del aporte del estudio genético molecular, clave en el diagnóstico diferencial de ambas patologías^(2,8,9).
- El análisis de los multímeros del VWF, aplicando electroforesis en geles de diferente composición^(12,24), permite evidenciar alteraciones del patrón multimérico. La ausencia o disminución de las formas multiméricas de diferente peso molecular puede detectarse de modo cualitativo o cuantificarse mediante densitometría, habiéndose actualmente desarrollado métodos comerciales^(5,12,24). La disminución selectiva de los HMWM es distintiva del VWD tipo 2A y 2B; en el tipo 2A puede haber además disminución de los multímeros de peso molecular intermedio (IMWM). El VWD tipo 2M se caracteriza por presentar toda la gama de multímeros. En algunos VWD tipo 1 puede observarse una disminución sutil de los HMWM. Cuando el defecto es producto del aumento de la depuración del VWF pueden observarse formas multiméricas de mayor peso molecular (ULMWM), como ocurre en el VWD tipo 1C. A pesar de sus limitaciones, el análisis del patrón multimérico es relevante en el diagnóstico de algunos casos de VWD⁽²⁵⁾.
 - El ensayo de unión del VWF al FVIII (VWF:FVIII) contribuye al diagnóstico del VWD tipo 2N, poniendo en evidencia la menor afinidad de la molécula de VWF anómala por el FVIII^(26,12). Comúnmente se aplican técnicas de ELISA para evaluar esta actividad⁽²⁶⁾.
 - La prueba denominada VWF:CB, evalúa la capacidad de la molécula de VWF de unirse al colágeno. Los ensayos más comunes aplican técnicas de ELISA o quimioluminiscencia, aunque también puede emplearse citometría de flujo^(27,12). Los resultados dependen del tipo de colágeno (I, III, IV y VI) utilizado⁽²⁾. Si bien no hay consenso respecto a la inclusión del VWF:CB dentro de las pruebas de primer nivel, ello permitiría detectar los VWD tipo 2M con defecto exclusivo en la capacidad de unión al colágeno que, de otro modo, no serían detectados⁽¹⁾. Sin la determinación del VWF:CB, individuos con VWD tipo 2M podrían ser clasificados como tipo 2A o tipo 1^(11,27). Además, se propone evaluar la unión a varios tipos de colágeno, a fin de poder detectar variantes moleculares del VWD tipo 2M con distinta respuesta según el colágeno utilizado^(2,11,27).
 - La cuantificación de la concentración del VWFpp se realiza por técnicas de ELISA^(12,28). Su determinación es de utilidad en la identificación de variantes con aumento de la depuración del VWF, que presentan alteración de la relación VWFpp/VWF:Ag basal, con valores aumentados (>2-3) respecto a los controles normales u otras variantes con sobrevida normal, como se observa, por ejemplo, en el VWD tipo 1 C^(1-3,28,29). También contribuye a discriminar entre VWD tipo 1 severo (VWF:Ag muy disminuido, VWFpp normal) y VWD tipo 3 (VWF:Ag y VWFpp disminuidos o ausentes)^(1,2,5,29).
 - Un aspecto adicional, que contribuye al diagnóstico y clasificación del VWD, es la respuesta observada luego de la administración de desmopresina (DDAVP)^(4,6,11,30). Los pacientes se pueden dividir en tres grupos: a) vida media reducida, b) sensible a DDAVP, c) no sensible a DDAVP⁽³⁰⁾. Si los niveles de VWF decaen antes de lo esperado, sugieren la presencia de una variante con sobrevida acortada^(4,6,11,30). Se observa además la alteración de la relación VWFpp/VWF:Ag basal^(1,3,29). Si las plaquetas decaen luego de 1-2 horas de la administración y se detecta disminución de la relación PD-VWFact/VWF:Ag o VWF:CB/VWF:Ag (valores <0,6), puede ser indicativo de VWD tipo 2B⁽³⁰⁾. Estimar los cocientes PD-VWFact/VWF:Ag y VWF:CB/VWF:Ag, después de administrar DDAVP, permite identificar la disociación actividad/antígeno típica de los pacientes con VWD2A y VWD2M^(11,30).

Detección de anticuerpos anti-VWF

Mencionamos previamente que los pacientes con VWD tipo 3 pueden desarrollar aloanticuerpos⁽⁷⁾ y que el mismo fenómeno podría darse también en otros tipos de VWD, como el 2B. La baja recuperación del VWF y/o su rápida depuración luego de la infusión de concentrados, es indicador de la presencia de un aloanticuerpo⁽⁷⁾. En casos de sospecha de AVWS, en

el contexto de defectos autoinmunes, lo que se investiga es la presencia de autoanticuerpos^(5,7). Tanto los aloanticuerpos como los autoanticuerpos pueden ser de tipo neutralizantes (inhiben al VWF) o no neutralizantes (forman complejos sin inhibir la función, pueden aumentar la depuración). Los anti-VWF neutralizantes son detectados en estudios de mezcla (paciente + normal); la acción inhibitoria, en general inmediata, puede manifestarse sobre una o varias de las actividades del VWF e incluso sobre el FVIII:C^(5,12). Los anti-VWF no-neutralizantes son detectados mediante pruebas de ELISA^(5,12). Lamentablemente no hay protocolos claramente definidos o consensuados para su estudio.

Control de la terapéutica

Aún hoy se debate cómo monitorear la respuesta a la terapia de reemplazo. Dado que los concentrados difieren en el contenido de FVIII y VWF, sería importante poder monitorear ambos parámetros, a fin de asegurar que se alcancen los niveles deseados⁽¹⁾; o al menos FVIII, en caso de no contar con la determinación de la actividad de VWF (VWF:RCo). Hay que considerar que la actividad de VWF puede ser no detectable, aún luego de la infusión de concentrados, en el caso de pacientes con anticuerpos neutralizantes de título muy alto⁽⁷⁾. Además, por el potencial riesgo trombótico asociado a niveles supra-fisiológicos de FVIII, es importante monitorear los niveles de FVIII durante el tratamiento prolongado, especialmente con concentrados de baja pureza⁽⁷⁾.

La evaluación de la respuesta al DDAVP se realiza determinando básicamente los niveles de VWF:Ag, VWF:RCo y FVIII antes de la administración de la droga y luego de 1, 2 y 24 horas posteriores a la misma; algunos grupos sugieren incluir un control también a las 4 horas^(4,6,11,12). La determinación concomitante de pruebas de función fibrinolítica, como el tiempo de lisis de euglobulinas, permiten detectar individuos con hiper-respuesta^(4,6), lo cual podría contrarrestar, en parte, el efecto terapéutico del DDAVP. Por otra parte es un indicador de respuesta a la droga administrada, independiente de la respuesta del VWF, sirviendo así como un control de la misma.

Análisis genético molecular

El análisis del gen *VWF* no se realiza de rutina, ya que las pruebas fenotípicas suelen ser suficientes

para el diagnóstico^(1,2,4,6,11). Se aplica en casos seleccionados, como metodología de diagnóstico complementaria principalmente en VWD tipo 2 y 3^(1,2,4,6,11). Permite detectar las variantes de la secuencia del *VWF* responsables de los VWD tipo 2N y 2B^(1,2,8); fundamental para el diagnóstico diferencial con las fenocopias, la hemofilia A leve⁽¹²⁾ y el PT-VWD⁽⁹⁾ con alteraciones en los genes *FVIII* y *GPIBA* respectivamente. En las familias con VWD tipo 3 puede ser útil para el asesoramiento genético (podría aplicarse potencialmente al diagnóstico prenatal) y para evaluar el riesgo de desarrollo de aloanticuerpos⁽²⁾.

El diagnóstico genético para el VWD tipo 1 es un desafío; sólo se detectan alteraciones en el gen *VWF* en aproximadamente el 65% de los casos^(2,10), lo que contrasta con la tasa de más del 90% de diagnóstico genético para VWD tipo 2 y 3. La relación genotipo-fenotipo en el VWD tipo 1 se caracteriza por expresión variable y penetración incompleta^(1,2). La variabilidad puede estar asociada, en parte, con la expresión de monómeros anómalos dentro de la estructura multimérica, al igual que ha sido descrito como base patogénica potencial para la expresión variable de una sustitución de tipo 2⁽²⁾. Hoy sabemos también que hay modificadores genéticos, fuera del *VWF* y factores fisiológicos que pueden jugar un papel en la expresión del VWF. La mayor parte (65%) de la variabilidad de los niveles de VWF en población sana es causada por factores genéticos^(2,31) y uno de sus principales determinantes es el grupo sanguíneo ABO^(1,2). La interacción genotipo-medio ambiente también es importante. La edad es un factor modificador del fenotipo, que puede llegar a normalizarse a lo largo del tiempo en pacientes VWD tipo 1⁽²⁾.

Hay hoy evidencias de una predisposición étnica al VWD; algunas variantes detectadas en poblaciones caucásicas, asociadas a VWD tipo 1 y también a VWD tipo 2, están presentes en poblaciones africanas normales, lo cual, al menos en parte, podría justificarse por herencia concomitante junto a otras variantes genéticas que pudieran modificar los niveles de VWF⁽²⁾.

Gracias a estudios de asociación de genoma completo (GWAS) se han identificado otros loci genéticos que regulan los niveles de VWF⁽²⁹⁾.

Es probable que los genes *STX2* y *STXBP5* estén implicados en la secreción de VWF, al interactuar con proteínas (SNARE) que participan en la exocitosis de los WPB⁽²⁹⁾. Por otra parte los determinantes de

grupo ABO, así como los genes *CLEC4M*, *SCARA5* y *STAB2* probablemente influyen en la depuración del VWF⁽²⁹⁾. Alteraciones en estas proteínas podrían explicar los niveles bajos de VWF en pacientes en los cuales no se detecta variación en la secuencia del *VWF*. Queda mucho por dilucidar, dado que estas variantes, a pesar de afectar moderadamente los niveles de VWF, no parecen asociarse con el fenotipo hemorrágico⁽²⁹⁾. A diferencia de lo hallado en VWD tipo 1, no se encontraron asociaciones entre loci genéticos fuera del *VWF* y la variación del nivel VWF en individuos con VWD tipo 2⁽²⁹⁾. La VWD tipo 1 muestra heterogeneidad no sólo de locus, sino además alélica. Los VWD tipo 1/variantes negativas tienden a estar asociados con un fenotipo de sangrado más leve⁽²⁾. Es posible que en individuos con VWD tipo 1, en los cuales no se han detectado variantes en la secuencia del *VWF* con las técnicas habituales, las variantes patogénicas puedan encontrarse en secuencias intrínsecas profundas o en regiones de regulación distales del gen *VWF*, que requieran una caracterización detallada de todo el gen para identificarlas. También es cada vez más evidente que los loci externos al gen *VWF* contribuyen al fenotipo VWD tipo 1.

Las nuevas metodologías aplicadas al estudio de la relación genotipo-fenotipo abren una perspectiva fascinante. Estudios recientes muestran que el análisis molecular de regiones relevantes del *VWF*, incluyendo regiones intrónicas y del promotor, permite identificar numerosas variantes en la secuencia del gen *VWF*, verificar su potencial efecto patogénico mediante análisis *in silico* y así clasificar o reclasificar pacientes con VWD, identificar portadores asintomáticos o pacientes en los cuales se había excluido la VWD por el fenotipo de laboratorio⁽¹⁰⁾. Estos estudios muestran una alta proporción de individuos en los cuales se identifican variantes potencialmente patológicas, con elevada correlación genotipo-fenotipo; lo cual podría cambiar el paradigma diagnóstico, sugiriendo que el estudio molecular podría pasar a formar parte de la primera línea de pruebas para el estudio de rutina, lo que llevaría a un tratamiento más personalizado y efectivo de los pacientes con VWD⁽¹⁰⁾. Los esfuerzos para descubrir el conjunto completo de determinantes genéticos de la variabilidad del VWF deberían conducir a una mejor comprensión de los mecanismos biológicos y de los complejos desórdenes clínicos en los que el VWF

juega un papel central, contribuyendo así a la identificación de individuos afectados y a un manejo más adecuado de los mismos⁽³¹⁾.

Conclusiones

Los ensayos desarrollados recientemente tendientes a determinar la concentración y la funcionalidad del VWF deberían contribuir a mejorar la precisión y disminuir los errores en su evaluación. Si bien el repertorio actual de pruebas permite diagnosticar y clasificar a una alta proporción de pacientes con VWD⁽¹¹⁾, queda el desafío de determinar por qué la severidad del fenotipo hemorrágico no siempre se correlaciona con los resultados de las pruebas de laboratorio⁽⁵⁾. Sería interesante el desarrollo de ensayos capaces de valorar la regulación de la capacidad hemostática del VWF, incorporando el efecto del flujo, así como la interacción con componentes de la pared vascular, para una evaluación más fisiológica de la función.

Por otra parte, la investigación actual tiene como propósito aclarar la relación genotipo-fenotipo en la VWD⁽³¹⁾. La innovación en las técnicas de secuenciación ha facilitado la realización del análisis genético molecular permitiendo descubrir variantes patogénicas en el gen *VWF* y contribuir a aclarar el rol de la genética en la categorización del VWD^(2,10). La combinación de los resultados de los estudios genéticos y los estudios funcionales permite hoy comprender mejor los determinantes genéticos de los niveles del VWF, el papel que juegan las variantes fuera del locus del *VWF* en la regulación de los niveles plasmáticos del VWF, así como las variantes genéticas que contribuyen al riesgo de sangrado.

La perspectiva, respecto a los aspectos diagnósticos, es la introducción de ensayos más rápidos y reproducibles, que permitan evaluar mejor las múltiples funciones del VWF, junto a la implementación, gracias a la innovación en las técnicas de secuenciación, de la identificación rutinaria de variantes en la secuencia del *VWF* o de sus genes modificadores.

Declaración de conflictos de interés:

La autora declara que no posee conflictos de interés.

Bibliografía

1. Leebeek FW, Eikenboom JC. Von Willebrand's Disease. N Engl J Med. 2016; 375: 2067-2080.
2. Swystun LL, Lillicrap D. How much do we really know about von Willebrand disease? Curr Opin Hematol. 2016; 23: 471-478.

3. Castaman G, Linari S. Diagnosis and treatment of von Willebrand disease and rare bleeding disorders. *J Clin Med.* 2017;6,45.
4. Woods AI, Blanco AB, Kempfer AC y col. Factor von Willebrand y Enfermedad de von Willebrand: nuevos enfoques diagnósticos. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 2016; 50: 273-289.
5. James AH, Eikenboom J, Federici AB. State of the art: von Willebrand disease. *Haemophilia.* 2016; 22 Suppl 5: 54-59.
6. Woods AI, Kempfer AC, Paiva J y col. Diagnosis of von Willebrand disease in Argentina: a single institution experience. *Ann Blood.* 2017; 2: 22 (1-24).
7. 7. Disease. *Semin Thromb Hemost.* 2017; [Epub ahead of print].
8. Castaman G, Federici AB. Type 2B von Willebrand Disease: A Matter of Plasma Plus Platelet Abnormality. *Semin Thromb Hemost.* 2016; 42: 478-82.
9. Sánchez-Luceros A, Woods AI, Bermejo E, y col. PT-VWD posing diagnostic and therapeutic challenges - small case series. *Platelets.* 2017; 28: 484-490.
10. Batlle J, Pérez-Rodríguez A, Corrales I y col. Molecular and clinical profile of von Willebrand disease in Spain (PCM-EVW-ES): Proposal for a new diagnostic paradigm. *Thromb Haemost.* 2016; 115: 40-50.
11. Favaloro EJ. Diagnosis or Exclusion of von Willebrand Disease Using Laboratory Testing. *Methods Mol Biol.* 2017; 1646: 391-402.
12. Blanco AN, Kempfer AC, Meschengieser S y col. Factor von Willebrand. *Fundamentos para el Manejo Práctico en el Laboratorio de Hemostasia.* Blanco A, Kordich L, Bermejo E, Forastiero R, Lauricella AM, Pieroni G, Quintana I, Scazzioti A. 2013, p 377-474, 2da Edición. Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires, La Plata.
13. Favaloro EJ. Clinical utility of closure times using the platelet function analyser-100/200. *Am J Hematol.* 2017; 92: 398-404.
14. Toulon P, Eloit Y, Smahi M y col. In vitro sensitivity of different activated partial thromboplastin time reagents to mild clotting factor deficiencies. *Int J Lab Hematol.* 2016; 38: 389-396.
15. Favaloro EJ, Mohammed S, Patzke J. Laboratory Testing for von Willebrand Factor Antigen (VWF:Ag). *Methods Mol Biol.* 2017; 1646: 403-416.
16. Mohammed S, Favaloro EJ. Laboratory Testing for von Willebrand Factor Ristocetin Cofactor (VWF:RCo). *Methods Mol Biol.* 2017; 1646: 435-451.
17. Bodó I, Eikenboom J, Montgomery R y col. Platelet-dependent von Willebrand factor activity. Nomenclature and methodology: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2015; 13: 1345-1350.
18. Just S. Laboratory Testing for von Willebrand Disease: The Past, Present, and Future State of Play for von Willebrand Factor Assays that Measure Platelet Binding Activity, with or without Ristocetin. *Semin Thromb Hemost.* 2017; 43: 75-91.
19. Szederjesi A, Baronciani L, Budde U y col. An international collaborative study to compare different von Willebrand factor glycoprotein Ib binding activity assays: the COMPASS-VWF study. *J Thromb Haemost.* 2018 [Epub ahead of print].
20. Favaloro EJ, Bonar R, Hollestelle MJ y col. Differential sensitivity of von Willebrand factor activity assays to reduced VWF molecular weight forms: A large international cross-laboratory study. *Thromb Res.* 2018; 166: 96-105.
21. Favaloro EJ, Mohammed S. Towards improved diagnosis of von Willebrand disease: comparative evaluations of several automated von Willebrand factor antigen and activity assays. *Thromb Res.* 2014; 134: 1292-1300.
22. Adcock DM, Strandberg K, Shima M, Marlar RA. Advantages, disadvantages and optimization of one-stage and chromogenic factor activity assays in haemophilia A and B. *Int J Lab Hematol.* 2018 [Epub ahead of print].
23. Frontroth JP, Favaloro EJ. Ristocetin-Induced Platelet Aggregation (RIPA) and RIPA Mixing Studies. *Methods Mol Biol.* 2017; 1646: 473-494.
24. Oliver S, Lau KKE, Chapman K, Favaloro EJ. Laboratory Testing for Von Willebrand Factor Multimers. *Methods Mol Biol.* 2017; 1646: 495-511.
25. Pérez-Rodríguez A, Batlle J, Corrales I y col. Role of multimeric analysis of von Willebrand factor (VWF) in von Willebrand disease (VWD) diagnosis: Lessons from the PCM-EVW-ES Spanish project. *PLoS One.* 2018; 13: e0197876.
26. Mohammed S, Favaloro EJ. Laboratory Testing for von Willebrand Factor: Factor VIII Binding (for 2N VWD). *Methods Mol Biol.* 2017; 1646: 461-472.
27. Favaloro EJ, Mohammed S. Laboratory Testing for von Willebrand Factor Collagen Binding (VWF:CB). *Methods Mol Biol.* 2017; 1646: 417-433.
28. Stufano F, Boscarino M, Bucciarelli P y col. Evaluation of the Utility of von Willebrand Factor Propeptide in the Differential Diagnosis of von Willebrand Disease and Acquired von Willebrand Syndrome. *Semin Thromb Hemost.* 2018 [Epub ahead of print].
29. Sanders YV, van der Bom JG, Isaacs A y col. CLEC4M and STXBP5 gene variations contribute to von Willebrand factor level variation in von Willebrand disease. *J Thromb Haemost.* 2015; 13: 956-966.
30. Federici AB. Current and emerging approaches for assessing von Willebrand disease in 2016. *Int J Lab Hematol.* 2016; 38 Suppl 1: 41-49.
31. Desch KC. Regulation of plasma von Willebrand factor. *F1000Res.* 2018; 7: 96.