

Diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand

Diagnosis of von Willebrand disease

Leonardo Mejía-Buriticá¹ , María Elena Pérez-Monterrosa²,
Jennifer C. Vizcaíno-Carruyo³ 

Resumen. La enfermedad de von Willebrand (EVW) es el trastorno hemorrágico hereditario más común, y se caracteriza por presentar disminución de la capacidad del factor von Willebrand (FVW) de unirse a las plaquetas y al colágeno de la matriz extracelular durante la hemostasia primaria, debido a defectos cuantitativos o cualitativos. La EVW se clasifica en tres fenotipos principales: el 1 y el 3 que son trastornos cuantitativos, y el 2 que se subclasifica en 2A, 2B, 2M y 2N, y refleja los trastornos cualitativos. Para su diagnóstico son necesarios varios pasos: 1) la evaluación del historial de sangrado personal y familiar del paciente, 2) detección inicial de trastornos hemorrágicos, 3) pruebas para la detección de la EVW, 4) pruebas para la tipificación de la EVW, y 5) el análisis molecular. Tanto la subclasificación de la EVW como su diagnóstico continúan planteando desafíos importantes, motivo por el cual se realiza esta revisión, de manera que los profesionales de la salud tengan una guía que los oriente al momento de tener pacientes con algún trastorno hemorrágico que amerite descartar una EVW e implementar un tratamiento adecuado.

Palabras clave: enfermedad de von Willebrand, factor von Willebrand, hemorragia, hemostasia, antígeno, ristocetina, agregación plaquetaria, genética.

Abstract. von Willebrand disease (VWD) is the most common hereditary bleeding disorder, and is characterized by a decreased ability of the von Willebrand factor (VWF) to bind to platelets and extracellular matrix collagen during primary hemostasis, due to quantitative or qualitative defects. VWD is classified into three main phenotypes: 1 and 3, which are quantitative disorders, and 2 (2A, 2B, 2M and 2N) that reflects qualitative disorders. Several steps are necessary for its diagnosis: 1)

¹ Médico, Especialista en Medicina Interna, Especialista en Hematología, Hospital Pablo Tobón Uribe. Medellín, Colombia. E-mail: lmejia@hptu.org.co.

² Bacterióloga y Laboratorista Clínica, Diplomado en Banco de Sangre y Medicina Transfusional. Laboratorio Clínico Hematológico. Medellín, Colombia.

³ Médica, Especialista en Hematología. Asistente Científica, Editora Médica Colombiana S.A. Medellín, Colombia.

Conflicto de interés: los autores declaran que no tienen conflicto de interés.

Medicina & Laboratorio 2023;27:139-155. <https://doi.org/10.36384/01232576.634>.

Recibido el 31 de octubre de 2022; aceptado el 26 de enero de 2023. Editora Médica Colombiana S.A., 2023[®].

evaluation of the patient's personal and family bleeding history, 2) initial screening tests for bleeding disorders, 3) tests for the detection of VWD, 4) tests for the classification of VWD, and 5) molecular analysis. Both the subclassification of VWD and its diagnosis continue to represent important challenges, which we aimed to describe in this review, so that health professionals have a guide to assist them when they have patients with a bleeding disorder that requires exclusion of VWD, and implementation of an appropriate treatment.

Keywords: von Willebrand disease, von Willebrand factor, hemorrhage, hemostasis, antigen, ristocetin, platelet aggregation, genetics.

Introducción

La enfermedad de von Willebrand (EVW) es el trastorno hemorrágico hereditario más común, que se caracteriza por presentar disminución de la actividad del factor von Willebrand (FVW), secundaria a un defecto cuantitativo o cualitativo [1]. El FVW es codificado por el gen *VWF* que abarca 178 Kb de ADN genómico en el cromosoma 12, y como glicoproteína multimérica se sintetiza en las células endoteliales y en los megacariocitos, siendo necesaria tanto para la adhesión plaquetaria al subendotelio como para la cohesión y agregación de plaquetas [2,3], asimismo, cumple una función de unión y estabilización del factor VIII de la coagulación [4]. Las principales manifestaciones clínicas de la EVW son sangrado excesivo y prolongado después de una cirugía, epistaxis y menorragia. Las mujeres son más propensas a tener sangrado sintomático por los desafíos hemostáticos adicionales de la menstruación y el parto, con un alto riesgo hemorrágico posparto y posible necesidad de transfusión [5-7].

La naturaleza grande y compleja del FVW, junto con sus múltiples interacciones, permite que se produzcan muchos patrones de función anormal [8],

que para practicidad de su estudio y tratamiento se clasifican en tres fenotipos principales: el 1 y el 3 que son cuantitativos, y el 2 que refleja trastornos cualitativos, a su vez, el fenotipo 2 se subclasifica en 2A, una variante con pérdida selectiva de multímeros del FVW; en 2B y 2M, que tienen la unión a la glicoproteína Ib plaquetaria α (GPIb α) aumentada o reducida, respectivamente; y en 2N, caracterizado por una unión reducida al factor VIII [8,9].

La prevalencia de la EVW varía de 1 en 100 a 1 en 10.000 personas [10]. Para el año 2020 a nivel mundial, se reportaron un total de 84.198 pacientes con este diagnóstico, de los cuáles 3.446 pertenecían a Colombia [11]. Afecta a personas de todas las razas, y se ha observado que su frecuencia es considerablemente mayor en regiones con tasas elevadas de consanguinidad [11-15]. La EVW se hereda de forma autosómica dominante o recesiva y afecta por igual a hombres y mujeres [1,3], sin embargo, la enfermedad se diagnostica más en mujeres dado que consultan frecuentemente por sangrado uterino y complicaciones obstétricas [11,16]. La edad de aparición de los síntomas es variable, y la mayoría de los pacientes no tienen o presentan pocos síntomas hemorrágicos, a menos que tengan una deficiencia grave de FVW que se

puede manifestar en la infancia como hemorragias articulares [11,17].

Debido a que la EVW es una patología que tiene un diagnóstico complejo y requiere de la implementación de varios tipos de pruebas para establecer su clasificación, se realiza esta revisión de la literatura, de manera que los profesionales de la salud tengan una guía que los oriente al momento de tener pacientes con algún trastorno hemorrágico que amerite descartar una EVW e implementar un tratamiento adecuado.

Estructura y función del factor von Willebrand

El FVW es una gran glicoproteína compuesta por una serie compleja de multímeros con pesos moleculares que oscilan entre 800 kDa y 20.000 kDa [18]. Se sintetiza en células endoteliales vasculares y megacariocitos, y se almacena en los cuerpos Weibel-Palade y en los gránulos α de las plaquetas [5,10]. Su gen *VWF* está situado en el brazo largo del cromosoma 12 y comprende 52 exones que codifican un polipéptido de 2.813 aminoácidos, que consta de un péptido señal de 22 aminoácidos y un propéptido de 741 aminoácidos, que se escinde durante el procesamiento intracelular (**figura 1**). La reducción completa de todos los enlaces disulfuro dentro del FVW produce un monómero de 250 kDa, que consta de 2.050 aminoácidos. Cada subunidad madura del FVW se dimeriza a través de enlaces disulfuro cerca del extremo carboxi-terminal [5,19], por lo tanto, dos monómeros se combinan para formar un dímero (540 kDa), también conocido como protómero, y la combinación de dos dímeros produce un multímero. Los multímeros pueden combinarse aún más para formar estructuras muy grandes de hasta 20 multímeros (80

monómeros), y pueden clasificarse de bajo peso molecular, intermedio, alto y ultra alto. El tamaño de los multímeros de FVW y su actividad están regulados por la enzima plasmática ADAMTS13 que escinde el FVW en el dominio A2 [5,10,18,20-22] (**figura 1**).

Con respecto a su función, cuando hay lesión de la pared vascular, el FVW participa en la hemostasia primaria al unirse al colágeno de la matriz extracelular y a las plaquetas. Los multímeros de alto peso molecular (HMWM, del inglés, *High Molecular Weight Multimers*) del FVW son particularmente eficientes como moléculas puente a través de la interacción con la GPIIb α y el colágeno subendotelial [2,22] (**figura 2**); por otra parte, en la hemostasia secundaria, actúa como cofactor del factor VIII (FVIII) para evitar su eliminación y degradación prematuras [1,20,24], de manera que cuando el FVW plasmático es bajo, el nivel plasmático de FVIII también se reduce [20].

Clasificación de la enfermedad de von Willebrand

Los hallazgos de laboratorio ayudan a clasificar los diferentes tipos de EVW. Existen criterios clínicos y de diagnóstico únicos para cada tipo, lo que hace que la clasificación sea importante en el manejo clínico.

EVW tipo 1

La EVW tipo 1 es la más común, representa entre el 75 % al 85 % de todos los casos, y se caracteriza por niveles bajos de FVW en plasma (**tabla 1**), con una estructura y función de FVW normales, con unión al FVIII normal [16,25,26]. A menudo se transmite con un patrón de herencia autosómico dominante, pero se asocia con haploinsuficiencia en el

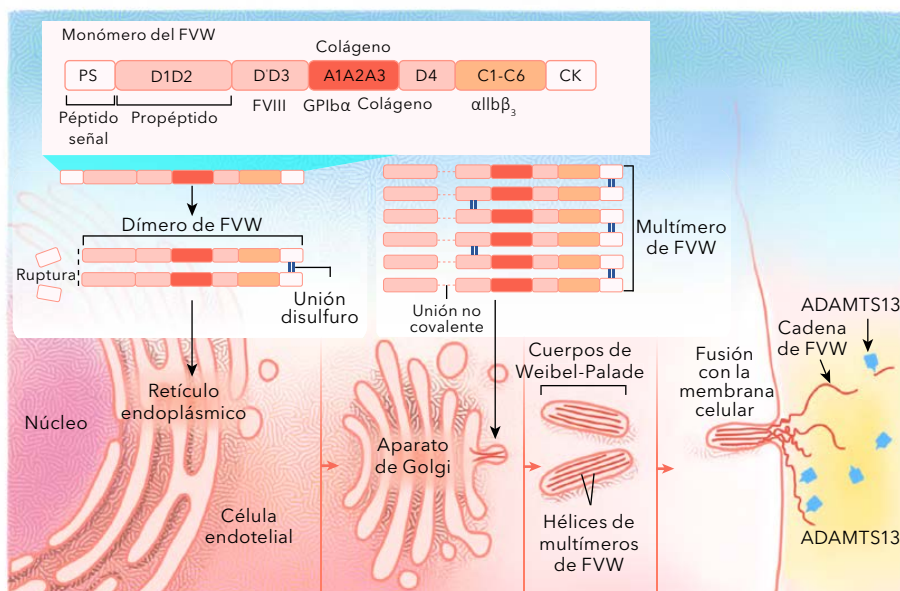


Figura 1. El factor von Willebrand (FVW) se sintetiza en el retículo endoplásmico de las células endoteliales como un propolipéptido, y se compone de varios dominios estructurales (de la A a la D) y sitios de unión respectivos involucrados en la interacción con el colágeno y las glicoproteínas plaquetarias Ib α (GPIb α) y al1b β 3. Después de la escisión del péptido señal (PS), las subunidades del FVW se dimerizan en el retículo endoplásmico. Cuando los dímeros de FVW llegan al aparato de Golgi, se forman multímeros de FVW a través de puentes disulfuro entre los dominios D3 y CK. El propéptido se escinde, pero permanece unido de forma no covalente al multímero de FVW en formación, lo que facilita la formación de enlaces disulfuro. El multímero de FVW se pliega para almacenarse en los cuerpos de Weibel-Palade, luego se fusionan con la membrana endotelial y hace que los multímeros de FVW pierdan su conformación tubular y se desplieguen en largas cadenas. Después de la secreción, los multímeros de FVW ultragrandes son proteolizados por la ADAMTS13 (una desintegrina y metaloproteínasa con un motivo de trombospondina tipo 1, número 13) en multímeros más pequeños que circulan en el plasma. Tomado y adaptado de [23].

locus del FVW [16], y mutaciones heterocigotas compuestas en los casos graves [15]. La mayoría (70 %) de las mutaciones son por cambio de sentido, seguidas de errores en la transcripción (9 %), deleciones pequeñas (6 %), mutaciones sin sentido (5 %) e inserciones o duplicaciones pequeñas (2 %) [27]. Estas mutaciones afectan principalmente los niveles de FVW a través de su síntesis, secreción, almacenamiento y aclaramiento [16]. Hay una distribución normal de multímeros, pero con una reducción de la intensidad de to-

das las bandas debido a la disminución general de la cantidad de FVW [20].

EVW tipo 2

El tipo 2 se observa en aproximadamente el 20 % a 25 % de los pacientes [1,6], y se basa en defectos funcionales específicos del FVW que afectan la agregación y/o adhesión plaquetaria, y la supervivencia del FVIII plasmático [15]. En general, las mutaciones responsables del tipo 2 son altamente

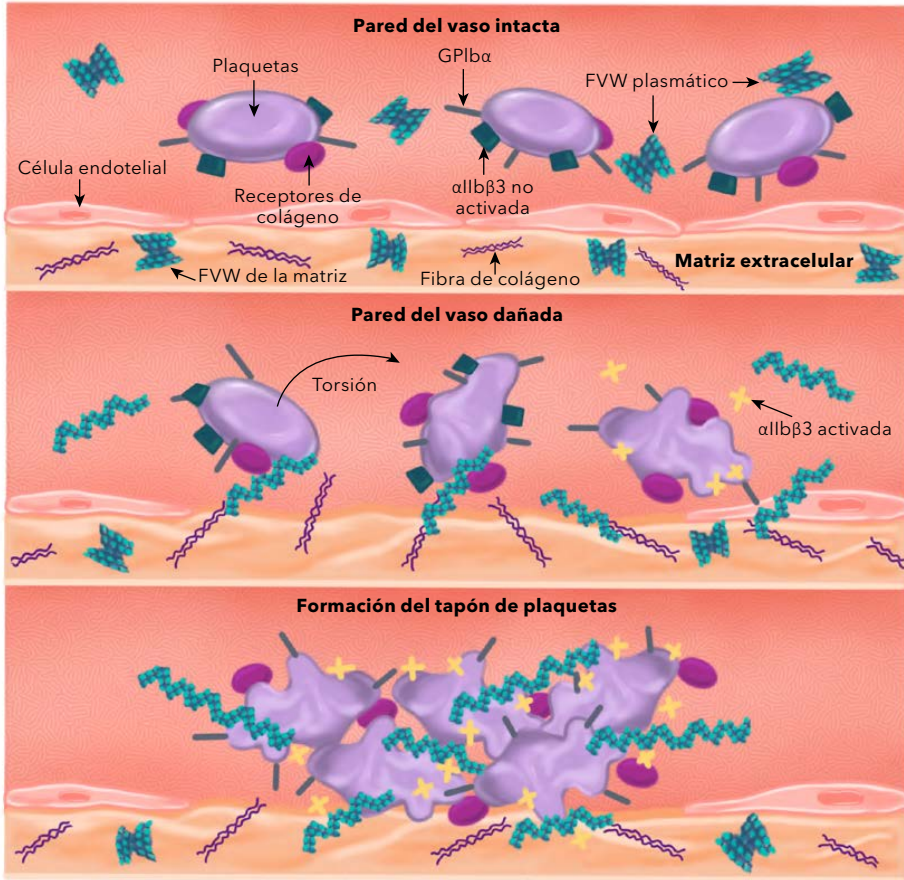


Figura 2. El FVW circula en el plasma en una forma globular, inactiva, sin interactuar con las plaquetas. Con el daño vascular y la exposición del colágeno del subendotelio, se une al colágeno y se desenrolla en cadenas adhesivas. El dominio A1 del FVW, que es el sitio de unión para la GPIb α , queda expuesto cuando se desenrolla, permitiendo su unión. Posteriormente se unen al colágeno por medio de los receptores de colágeno plaquetario, y se adhieren y activan a través de la interacción FVW-GPIb α , lo que lleva a un cambio conformacional en la integrina plaquetaria α IIb β 3, que hace que adquieran una forma irregular. El FVW y el fibrinógeno se unen a la integrina α IIb β 3 activada, lo que conduce a la agregación de las plaquetas activadas y formación de un trombo. Tomado y adaptado de [5].

penetrantes, y el fenotipo sangrante es fuertemente reproducible dentro de una familia determinada.

El subtipo 2A es el más común, se hereda con un patrón autosómico dominante [15], y representa un déficit funcional del FVW debido a la pérdida de HMWM, causada por una mayor susceptibilidad a la escisión de la ADAMTS13 o a una

formación anormal de multímeros antes de la liberación de las células endoteliales [29] (**tabla 1**). Los hallazgos típicos de laboratorio son notables por un nivel de actividad de FVW dependiente de plaquetas inferior a 30 UI/dL (%), con un nivel de antígeno del factor von Willebrand (FVW:Ag) ligeramente bajo o normal. La prueba de multímeros demuestra la pérdida de HMWM con

Tabla 1. Clasificación de la enfermedad de von Willebrand. Tomado y adaptado de [3,28]

Tipo	Definiciones
1	Déficit cuantitativo parcial de FVW
2	Alteración cualitativa de FVW
2A	Disminución de la actividad del FVW dependiente de plaquetas, debido a la deficiencia de IMWM y HMWM
2B	Aumento de la afinidad del FVW por la glicoproteína plaquetaria Iba, con ausencia de HMWM
2M	Disminución de la actividad del FVW dependiente de plaquetas, con patrón de multímeros normal
2N	Afinidad de unión del FVW por el factor VIII marcadamente reducida
3	Déficit cuantitativo completo de FVW

FVW: factor von Willebrand; HMWM: multímeros de alto peso molecular ; IMWM: multímeros de peso molecular intermedio.

conservación de los multímeros más pequeños [29].

El tipo 2B se caracteriza por una mutación de ganancia de función en el FVW, con patrón de herencia autosómica dominante, que causa una mayor afinidad de este por el receptor plaquetario GPIIb α (**tabla 1**), resultando en una unión espontánea del FVW a las plaquetas *in vivo*, con formación de agregados que por escisión de ADAMTS13, son eliminados de la circulación. Finalmente, hay una disminución general del FVW plasmático y una pérdida significativa de los HMWM con trombocitopenia, que no siempre está presente, siendo un factor de riesgo adicional de hemorragia [15,29,30].

La EVW subtipo 2M se caracteriza por un defecto cualitativo en el FVW con distribución de multímeros conservada [31]. Las mutaciones identificadas en estos pacientes, más comúnmente en el dominio A1, afectan la interacción del FVW con la GPIIb α plaquetaria o con el colágeno, pero no afectan la integración de los multímeros (**tabla 1**) [15,29].

La EVW subtipo 2N es un defecto cualitativo, con herencia autosómica recesiva, en donde la capacidad de unión del FVW al FVIII está significativamente disminuida. Las mutaciones sin sentido en el dominio donde el FVW se une al FVIII son las responsables [2]. Los pacientes exhiben una función del FVW dependiente de plaquetas y nivel de FVW normales, pero el nivel de FVIII en plasma está severamente disminuido debido al aumento de su proteólisis, por lo que puede confundirse con una hemofilia A leve [29,32].

EVW tipo 3

La EVW tipo 3 se observa en poco más del 5 % de los casos, es la forma menos común y la más grave en todos los individuos afectados, ya que prácticamente no producen FVW (**tabla 1**), debido a la homocigosidad o heterocigosidad compuesta para los alelos nulos en el gen *VWF*. Este tipo tiene herencia autosómica recesiva [1], y los parientes heterocigotos generalmente presentan síntomas hemorrágicos leves o nulos [15]. Los pacientes tipo 3 o los subtipo

2N pueden tener hemorragias articulares debido al nivel bajo de FVIII [25], asemejando una hemofilia A [20].

Clínica

Muchos varones con EVW tipo 1 con deficiencia leve o moderada pueden ser asintomáticos, y ser diagnosticados en la edad adulta solo cuando se presenta algún reto hemostático como trauma o cirugía. Las mujeres por el contrario, suelen cursar con menstruaciones abundantes desde la adolescencia, por lo cual buscan atención médica. En los pacientes con EVW tipo 1, las manifestaciones hemorrágicas se correlacionan con el grado de deficiencia del FVW, y usualmente son leves. En general, las hemorragias más frecuentes suelen ser mucocutáneas, con equimosis que aparecen de manera espontánea o con traumas mínimos, al igual que la epistaxis y el sangrado uterino abundante. Puede haber sangrado posoperatorio luego de procedimientos quirúrgicos y odontológicos como extracciones dentales, principalmente en las variantes 2A, 2B y 2M. En la 2A se ha demostrado que el riesgo de sangrado es muy superior a la 2M [2]. La hemartrosis y el hematoma muscular profundo se observan raramente en los tipos 1 y 2, pero en el tipo 3 pueden presentarse y ser similares a las manifestaciones de una hemofilia moderada [6,33], al igual que en el subtipo 2N donde se pueden presentar en relación con traumatismos o cirugía [2]. Tanto en la EVW tipo 3 como en el subtipo 2A, se pueden presentar hemorragias gastrointestinales de difícil manejo [6,33].

Diagnóstico

Debido a que el FVW es una glicoproteína multimérica y multifuncional con

varios dominios que contienen diversos sitios de unión, se requiere más de una prueba y varios pasos para evaluar todas sus funciones, los cuales serían: 1) la evaluación del historial de sangrado personal y familiar del paciente, 2) detección inicial de trastornos hemorrágicos, 3) pruebas para la detección de la EVW, 4) pruebas para la tipificación de EVW y, por último, 5) el análisis molecular [3,15].

Herramientas de evaluación de la hemorragia

En 2021, la *American Society for Haematology* (ASH), la *International Society for Thrombosis and Haemostasis* (ISTH), la *World Federation of Haemophilia* (WFH) y la *National Haemophilia Foundation* (NHF), colaboraron para producir dos guías sobre el diagnóstico y manejo de la EVW [34], en ellas se menciona que es importante que se utilicen en la atención primaria, los puntajes establecidos por las herramientas de evaluación de hemorragia (BAT, del inglés, *Bleeding Assessment Tools*), antes de que se tome la decisión de derivar al paciente para la investigación de una EVW. Su utilidad radica en determinar qué pacientes requieren pruebas de laboratorio, pero ante una alta sospecha de EVW, se recomienda proceder directamente a las pruebas de laboratorio [1]. Estas herramientas generalmente comprenden un cuestionario de hemorragia y una escala de gravedad; cada síntoma hemorrágico (14 en total) se puntúa de 0 (ausencia o síntoma trivial) a 3 o 4 para los síntomas más graves (sangrado que requiere transfusión de hemoderivados). Los puntajes totales normales para pacientes adultos que usan la BAT varían de 0 a 3 en sujetos masculinos, y de 0 a 5 en sujetos femeninos. Por lo tanto, las pruebas de laboratorio para la EVW

(y/o trastornos hemorrágicos adicionales) deben considerarse en pacientes masculinos con una puntuación ≥ 4 , en mujeres con una puntuación ≥ 6 , y en niños con una puntuación ≥ 3 [1,6,35]. Los pacientes con una puntuación de 10 tienen la mayor incidencia de hemorragia [25].

Pruebas de detección inicial

La detección de defectos primarios de la hemostasia se puede realizar evaluando el recuento de plaquetas y el tiempo de cierre del analizador de función plaquetaria (PFA-200). Esta prueba no se realiza de rutina porque puede ser normal en la EVW tipo 1 cuando el nivel del FVW es de 30 UI/dL (%) a 50 UI/dL (%), sin embargo, en la tipo 2 (excluyendo el 2N) y en la tipo 3, su sensibilidad es cercana al 100 % [3,36]. La detección de defectos de hemostasia secundarios se puede realizar utilizando el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (TPT). El TP es normal en la EVW, pero el TPT puede prolongarse debido al nivel reducido de FVIII que se presenta en algunos subtipos de EVW [3].

Pruebas para el diagnóstico de EVW

Las pruebas de laboratorio iniciales para el diagnóstico específico de la EVW, son la medición del nivel total del FVW a través del antígeno del FVW (FVW:Ag), la medición de la actividad del FVIII en plasma (FVIII:C) y la medición de la actividad del FVW (FVW:RCo) [25]. Los valores de estas pruebas se pueden reportar en unidades internacionales por mililitro (UI/mL), en unidades internacionales por decilitro (UI/dL) o en la forma convencional de reportar valores coagulométricos (en porcentaje) [15,37].

Antígeno del FVW

El nivel plasmático del FVW:Ag se mide mediante métodos inmunológicos, generalmente mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o mediante un inmunoensayo de látex automatizado (LIA), que se basa en el aumento de la turbidez de una suspensión de micropartículas de látex medida por fotometría; este último puede dar resultados falsamente altos en presencia de factor reumatoide [6,36]. Se debe tener en consideración que como el FVW es una proteína de inflamación, sus valores aumentan cuando el endotelio vascular está afectado. La prueba de ELISA tiene límites de detección de 0,5 UI/dL (%) y 1 UI/dL (%), inferiores al de la prueba de LIA (límite de detección de 10 UI/dL [%]), por lo que este último método no es apto para discriminar entre las formas severas de EVW tipo 3 (FVW:Ag < 1 UI/dL [%]) o tipo 1 (FVW:Ag < 5 UI/dL [%]). Su intervalo biológico de referencia es de 50 % (UI/dL) a 160 % (UI/dL) [3,6].

De acuerdo con las guías actuales, el diagnóstico de EVW tipo 1 se establece con un nivel de FVW < 30 UI/dL (%), independientemente de la presencia o no de sangrado, o FVW de 30 UI/dL (%) a 50 UI/dL (%) con sangrado anormal [10,34]; este grupo era anteriormente considerado como pacientes con "FVW bajo", lo que hacía que no recibieran la atención adecuada debido a la falta de un diagnóstico claro. El beneficio de usar un punto de corte alto (50 UI/dL [%]) para la EVW tipo 1, es no pasar por alto el diagnóstico en un paciente afectado por un fenotipo hemorrágico; por otra parte, el beneficio de usar un punto de corte bajo (< 30 UI/dL [%]) es evitar proporcionar un tratamiento innecesario a un paciente que no tiene EVW [10,38].

El nivel de FVW:Ag en personas con grupo sanguíneo O es entre un 25 % y un 30 % más bajo que en las personas con los grupos sanguíneos A, B y AB; muchas de ellas, a pesar de que tienen un valor de FVW <50 % (UI/dL), se considera que poseen una variación normal [34,36,39,40]. Otras causas de variaciones no patológicas serían la edad [15,29,34], el ejercicio y el embarazo, donde hay aumento del FVW [16,39].

Actividad del FVW

La actividad del FVW en presencia del cofactor ristocetina (FVW:RCo), también conocida como actividad del FVW dependiente de plaquetas, refleja la capacidad del FVW para interactuar con el receptor plaquetario GPIIb/IIIa [3]. Esto se mide a través del antibiótico ristocetina que se une al FVW y promueve su capacidad para unirse con las plaquetas, actuando como cofactor estimulador del FVW en el plasma [3]. De esta manera, la sangre que contenga una cantidad adecuada del FVW se coagulará con normalidad, mientras que la que no la tenga, no tendrá la capacidad de hacerlo. La tasa de aglutinación inducida por ristocetina está relacionada con la concentración del FVW y el porcentaje de actividad, y su medición se realiza por medio de un agregómetro. Una de sus desventajas es la poca sensibilidad, ya que el límite inferior de detección generalmente es de 10 UI/dL (%), por lo que la identificación se hace difícil cuando el nivel de FVW:Ag está por debajo de ese valor [6]. Otras serían el alto coeficiente de variación, la posibilidad de resultados falsos debido a defectos en la capacidad del FVW para unirse a la ristocetina, y que sus resultados se ven afectados por situaciones como el embarazo y la infusión de concentrados comerciales de factor

VIII [25]. Adicionalmente, existe una sensibilidad conocida a un polimorfismo específico del FVW (D1472H), que hace que el FVW no sea reactivo a la ristocetina. Su intervalo biológico de referencia es de 56 % (UI/dL) a 187 % (UI/dL). La marcada disminución de FVW:RCo (<20 %), con niveles de FVW:Ag y FVIII normales o modestamente disminuidos, pueden confirmar la EVW tipo 2A [26].

Con el fin de superar algunas de las debilidades de las pruebas con ristocetina, se crearon pruebas funcionales que también evalúan la actividad del FVW dependiente de plaquetas. A estas pruebas se les dio una nueva nomenclatura para diferenciarlas del FVW:RCo, y son la prueba de unión del FVW a un fragmento de GPIIb/IIIa con una mutación de ganancia de función (FVW:GPIIbM) y la de unión del FVW a un fragmento de GPIIb/IIIa desencadenada por ristocetina (FVW:GPIIbR) [6,15,33,34]. Estas muestran menos variabilidad, y son más precisas en niveles más bajos, con un límite inferior de detección de 2 UI/dL (%) y un coeficiente de variación del 5,6 %, adicionalmente, existe una correlación importante entre los resultados de la FVW:RCo y los de la FVW:GPIIbM [3,25,34]. Debido a esto, en la última guía publicada en el 2021 para el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand, se sugiere el uso de FVW:GPIIbM y FVW:GPIIbR en lugar de la FVW:RCo [10], no obstante, estas pruebas no están aprobadas todavía por la FDA [34], y su disponibilidad comercial es limitada en muchos países [25], incluyendo Colombia.

Actividad del FVIII

La prueba de actividad del factor VIII (FVIII:C) se incluye entre las pruebas de detección de la EVW, porque el FVW es una proteína transportadora

del FVIII [33]. La FVIII:C se puede obtener utilizando el ensayo de coagulación de una etapa (coagulométrico) o el ensayo cromogénico. Los pacientes del tipo 3 pueden tener marcada deficiencia del FVIII <10 % (UI/dL) y nivel del FVW no detectable, lo que determina la gravedad del sangrado en el paciente. En los subtipos 2A, 2B y 2M, el FVIII puede estar disminuido, pero por lo general es normal. En el tipo 2N, el nivel de FVW es normal, pero su capacidad reducida para unirse al FVIII da como resultado un nivel bajo de FVIII:C, ya que este se degrada por proteólisis [3,33]. El intervalo de referencia normal es de 50 % (UI/dL) a 150 % (UI/dL). La EVW de tipo 3 se caracteriza por tener un nivel de FVIII muy bajo de 1 UI/dL a 9 UI/dL (1 % a 9 %), con antígeno y actividad del FVW indetectables [26].

Índices de actividad FVW:RCo/FVW:Ag y FVIII:C/FVW:Ag

La relación entre la actividad del FVW dependiente de las plaquetas (FVW:RCo) y la concentración del FVW:Ag (FVW:RCo/FVW:Ag), refleja un índice cuyo valor normal solía ser mayor de 0,5 o de 0,6 en las guías publicadas, pero en el 2021 hubo un cambio y se sugirió que debido a una mayor sensibilidad y especificidad, el valor de corte de la relación fuera de 0,7 [10,34,38]. Este índice es capaz de diferenciar la mayoría de los pacientes tipo 2 de los de tipo 1; si la relación es $>0,7$ (normal) se asocia al tipo 1, y si es $<0,7$ se asocia con el tipo 2, sin diferenciar sus subtipos excepto en el 2N, donde está normal. En este último, otra alternativa es la relación FVIII:C/FVW:Ag, que es el único donde está $<0,7$ [3,10,33,41,42], por lo tanto, esta relación baja asociada a un nivel de FVIII bajo con un FVW normal o casi normal, puede indicar

EVW subtipo 2N o una hemofilia A leve [15,26,43].

Pruebas para tipificar la EVW

Estas se utilizan con la finalidad de clasificar las variantes de la EVW. Se aplican cuando se detecta un nivel bajo de FVW y/o una relación FVW:RCo/FVW:Ag $<0,7$ [15].

Multímeros de FVW

Esta prueba evalúa los multímeros de diferentes pesos moleculares que conforman el FVW. Estos se utilizan para especificar los subtipos de EVW tipo 2 cualitativos, mediante la evaluación de su presencia y distribución. Se pueden analizar en plasma citratado mediante electroforesis e inmunofijación en gel de agarosa con dodecilsulfato de sodio, en condiciones no reductoras [3,36,44]. El FVW, gracias a la utilización de un anticuerpo marcado con peroxidasa, se visualiza como varias bandas de diferente peso molecular, las de movimiento más rápido se indican convencionalmente como multímeros de bajo peso molecular (LMWM, del inglés, *Low Molecular Weight Multimers*), seguidas de los multímeros de peso molecular intermedio (IMWM, del inglés, *Intermediate Molecular Weight Multimers*), mientras que las bandas de movimiento más lento se indican como HMWM [3]. La EVW subtipos 2M y 2A son similares, y la distinción entre ellos depende de la electroforesis en gel de los multímeros de FVW [15,26,45,46].

Unión del FVW al colágeno

Para que el FVW pueda mediar de manera efectiva el reclutamiento de plaquetas durante la hemostasia primaria, debe unirse al colágeno subendotelial expuesto en los sitios de lesión vascular

[6], por lo que se desarrolló la prueba de actividad de unión del FVW al colágeno (FVW:CB), teniendo en cuenta que hay diferentes tipos de colágenos vasculares que interactúan con el FVW; los tipos I y III de colágeno se unen al dominio A3 del FVW, mientras que los tipos IV y VI se unen a través del dominio A1 [6,25]. Los métodos de ELISA están disponibles para medir esta interacción, pero también existe un método quimio-luminiscente automatizado [3], y ambos son sensibles a la pérdida de HMWM del FVW [36]. Un gran estudio multicéntrico de los Estados Unidos sobre pacientes con todos los tipos de EVW, ha mostrado una incidencia relativamente alta de defectos de unión al colágeno tipo IV y VI en pacientes con EVW tipo 1 (5 %) y el subtipo 2M (27 %) [25]. Dado que se ha demostrado que esta prueba se reduce en todas las variantes de EVW de tipo 2, con la excepción del 2M donde está normal, podría proponerse como una herramienta de detección sensible para esta última [2,3,6,47].

Unión del factor von Willebrand al factor VIII

Las mutaciones del FVW en los dominios D1 y D3 de unión al FVIII pueden afectar la interacción de ambos. La evaluación de la unión del FVW al factor VIII recombinante (FVW:FVIII_B), se realiza mediante un ensayo de ELISA que estima la capacidad del FVW para unirse a una fuente exógena de FVIII recombinante [3], asimismo, se puede evaluar mediante un ensayo de unión en placa inmunoabsorbente, pero debido a que ambos son técnicamente difíciles, el análisis genético ofrece una alternativa práctica [36]. Con esta prueba es posible discriminar la EVW subtipo 2N, en donde el nivel de FVIII:C está notablemente reducido 10 % (UI/dL), en comparación al nivel normal de FVW:Ag y de FVW:RCo [3,10,15,32,36].

RIPA

La prueba de agregación plaquetaria inducida por ristocetina a diferentes concentraciones (RIPA), se evalúa mediante un agregómetro y requiere del uso de una muestra de sangre fresca, que se centrifuga poco después de su recolección para obtener un plasma rico en plaquetas (PRP) [48]. El PRP se normaliza a 250.000 plaquetas/ μ L utilizando el plasma del paciente pobre en plaquetas, que luego se usa para evaluar el valor umbral de ristocetina capaz de inducir un 30 % de agregación plaquetaria. En la población normal, los sujetos con 150 UI/dL (%) de actividad de FVW dependiente de plaquetas, requieren cantidades bajas de ristocetina (0,8 mg/mL) para obtener el 30 % de aglutinación de plaquetas, mientras que los sujetos con 50 UI/dL (%) de actividad de FVW dependiente de plaquetas, requerirán mayor cantidad (1,2 mg/mL) [3]. La agregación de plaquetas a bajas concentraciones de ristocetina (<0,5 mg/mL hasta 0,7 mg/mL) sugiere un aumento patológico de la interacción FVW-GPIIb α , que es típica de la EVW subtipo 2B, en donde muchas veces la única característica anormal presente es la positividad de la RIPA [26,36]. Esta prueba se debe realizar en todos los pacientes con cocientes de la relación FVW:RCo/FVW:Ag reducido o cuando hay trombocitopenia [36], y su rango normal está entre 0,8 mg/mL a 1,2 mg/mL de ristocetina [3].

En la **tabla 2** se describen las características de laboratorio de los de los tipos y subtipos de la EVW.

Pruebas genéticas

Aunque se han enumerado muchas variantes que causan EVW, la etiología genética sigue sin estar definida en muchos pacientes [49]. Estudios de

Tabla 2. Características de laboratorio de los tipos y subtipos de la enfermedad de von Willebrand. Tomado y adaptado de [39]

Prueba de laboratorio	Importancia fisiopatológica	Subtipo 1	Subtipo 2A	Subtipo 2B	Subtipo 2M	Subtipo 2N	Subtipo 3
PFA-200	Simula la hemostasia primaria después del daño a un vaso pequeño	Prolongado o normal	Prolongado, sin cierre	Prolongado, sin cierre	Prolongado, sin cierre	Normal	Prolongado, sin cierre
TPT	Refleja el grado de reducción del FVIII	Prolongado o normal	Prolongado o normal	Prolongado o normal	Prolongado o normal	Prolongado	Prolongado
Conteo plaquetario	Aumento de la afinidad por GPIIb/IIIa en el tipo 2B	Normal	Normal	Bajo o normal	Normal	Normal	Normal
FVIII:C	Interacción factor FVIII-FWV	Baja o normal	Baja o normal	Baja o normal	Baja o normal	Proporcionalmente baja	Baja <10 UI/dL (%)
FWV:Ag	Concentración del antígeno del FWV	Bajo	Bajo o normal	Bajo o normal	Normal o bajo	Normal o bajo	Muy bajo <5 UI/dL (%)
FWV:RCo	Interacción FWV-GPIIb mediada por ristocetina <i>in vitro</i>	Bajo	Muy baja <20 UI/dL (%)	Variablemente baja	Baja	Normal o baja	Muy baja <5 UI/dL (%)
FWV:CB	Interacción FWV: colágeno	Baja, raramente normal	Muy baja	Baja	Normal	Normal o baja	Muy baja <5 UI/dL (%)
FWV:RCo/FWV:Ag	Diferenciación entre la EVW tipo 1 y la 2	Normal (>0,7)	Bajo (<0,7)	Bajo (<0,7)	Bajo o normal	Normal (>0,7)	Variable
RIPA utilizando las plaquetas del paciente	Concentración óptima de ristocetina que induce la agregación del plasma rico en plaquetas del paciente	Reducida o normal	Reducida o normal	Ocurre en concentraciones más bajas que en los sujetos normales	Reducida o normal	Normal	Ausente
Patrón de los multímeros de FWV	Composición multimérica del FWV	Patrón normal, FWV reducido	Faltan los multímeros grandes e intermedios	Faltan los multímeros grandes	Distribución normal de los multímeros (pero posiblemente con bandas anormales)	Normal	Multímeros ausentes

FWV: factor von Willebrand; TPT: tiempo de tromboplastina parcial activado; FVIII:C: actividad del factor VIII; FWV:Ag: antígeno del FWV; FWV:RCo: actividad del FWV; FWV:CB: actividad de unión del FWV al colágeno; FWV:RCo/FWV:Ag: cociente de la relación entre la actividad y el antígeno del FWV; RIPA: agregación plaquetaria inducida por ristocetina a varias concentraciones; GPIIb/IIIa: glicoproteína IIb/IIIa; PFA-200: Platelet Function Analyzer-200.

cohortes recientes han informado de mutaciones del FVW en 65 % de los pacientes con EVW tipo 1, que fueron más comunes en pacientes con nivel plasmático de FVW:Ag <30 UI/dL (%), que en aquellos con nivel de FVW entre

30 UI/dL (%) a 50 UI/dL (%) [6]. Una de las mutaciones estudiadas, la R1374C, se ha reportado en asociación con el tipo 1, y los subtipos 2A y 2M [8]. Entre los beneficios del estudio genético, está que las familias con EVW tipo 3

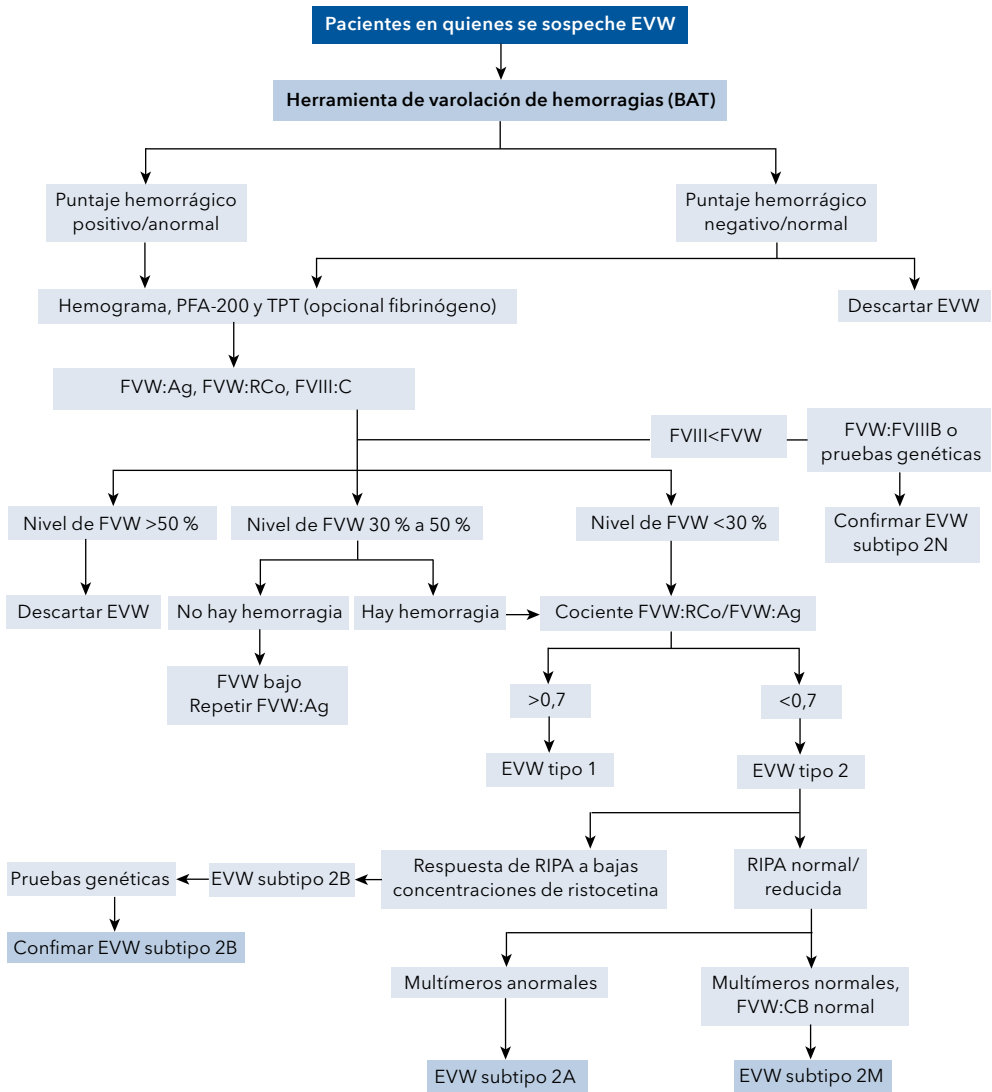


Figura 3. Algoritmo diagnóstico de los tipos y subtipos de enfermedad de von Willebrand. FVW: factor von Willebrand; TPT: tiempo de tromboplastina parcial activado; FVIII:C: actividad del factor VIII; FVW:Ag: antígeno del FVW; FVW:RCo: actividad del FVW; FVW:CB: actividad de unión del FVW al colágeno; FVW:RCo/FVW:Ag: cociente de la relación entre la actividad del FVW y el antígeno del FVW; FVW:VIII B: unión del FVW al factor VIII recombinante; RIPA: agregación plaquetaria inducida por ristocetina a varias concentraciones. Tomado y adaptado de [10].

pueden solicitar el diagnóstico prenatal, particularmente cuando los padres ya tienen un hijo afectado [36,50]. Una de las desventajas de las pruebas genéticas es que se han encontrado muchas variantes del gen *VWF* que anteriormente se denominaban patógenas en individuos sanos, particularmente en la población afroamericana. También existe escasa correlación entre las variantes genéticas y la EVW tipo 1, que es la más común [25,51].

La caracterización molecular del gen *VWF* no es indispensable para el diagnóstico de la EVW en pacientes que se han sometido a pruebas fenotípicas, pero son de gran ayuda en los casos donde no se dispone de las otras pruebas [15]. Adicionalmente, se sugiere que se realicen pruebas genéticas en pacientes con sospecha de EVW subtipo 2B y RIPA a bajas dosis positiva, y para el 2N [30,34,36]. Con respecto al beneficio de las pruebas genéticas sobre la RIPA a bajas dosis en el diagnóstico del subtipo 2B, los estudios reportados son de baja certeza, y sería beneficioso realizar investigaciones adicionales [10].

Una forma práctica de lograr el diagnóstico de los tipos y subtipos de la EVW es a través de algoritmos, como el que se presenta en la **figura 3**.

Conclusión

El diagnóstico oportuno de la EVW es importante para establecer el tratamiento más adecuado para el paciente y garantizar un asesoramiento óptimo. Aunque no se necesitan todas las pruebas de tipificación de la EVW para obtener el diagnóstico de los pacientes, es importante evaluar la consistencia de los resultados que se obtienen, ya que debido a la variabilidad

que se puede presentar en los niveles de FVW por el grupo sanguíneo, edad del paciente, embarazo o píldoras anticonceptivas [6], a veces necesitan repetirse más de una vez, por ejemplo, en los casos de deficiencias leves. Debido a la falta de pruebas específicas, es probable que algunos pacientes con EVW sean diagnosticados erróneamente con hemofilia, basándose en los resultados del FVIII; así mismo, se puede confundir con el síndrome de Bernard Soulier, cuando solo se considera la agregación plaquetaria de forma aislada, y con la trombocitopenia inmunomediada [52].

Las técnicas de biología molecular, como la secuenciación de próxima generación, están cada vez más disponibles en los laboratorios de diagnóstico, y en los últimos años se han producido nuevos conocimientos en la comprensión de los mecanismos biológicos implicados en la patogenia de la EVW. Esto ha traído importantes avances en relación con los algoritmos de diagnóstico, como el presentado, y las opciones terapéuticas para la EVW. No obstante, tanto el diagnóstico como la subclasificación de la EVW continúan planteando desafíos importantes para los médicos en la práctica clínica.

Referencias

1. **Weyand AC, Flood VH.** von Willebrand disease: Current status of diagnosis and management. *Hematol Oncol Clin North Am* 2021;35:1085-1101. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2021.07.004>.
2. **Tosetto A, Castaman G.** How I treat type 2 variant forms of von Willebrand disease. *Blood* 2015;125:907-914. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-08-551960>.
3. **Baronciani L, Peyvandi F.** How we make an accurate diagnosis of von Willebrand disease. *Thromb Res* 2020;196:579-589. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.07.010>.

4. **Kreuz W.** von Willebrand's disease: from discovery to therapy - milestones in the last 25 years. *Haemophilia* 2008;14:S1-2. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2008.01846.x>.
5. **Mannucci PM.** Treatment of von Willebrand's disease. *N Engl J Med* 2004;351:683-694. <https://doi.org/10.1056/NEJMra040403>.
6. **Fogarty H, Doherty D, O'Donnell JS.** New developments in von Willebrand disease. *Br J Haematol* 2020;191:329-339. <https://doi.org/10.1111/bjh.16681>.
7. **Sladič M, Verdenik I, Smrkolj Š.** The effect of von Willebrand Disease on pregnancy, delivery, and postpartum period: A retrospective observational study. *Medicina (Kaunas)* 2022;58. <https://doi.org/10.3390/medicina58060774>.
8. **Millar C.** Why and how do we classify von Willebrand disease? *Haemophilia* 2015;21:407-410. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/hae.12725>.
9. **Budde U.** Diagnosis of von Willebrand disease subtypes: implications for treatment. *Haemophilia* 2008;14 Suppl 5:27-38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2008.01849.x>.
10. **James PD, Connell NT, Ameer B, Di Paola J, Eikenboom J, Giraud N, et al.** ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood Adv* 2021;5:280-300. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003265>.
11. **World Federation of Hemophilia (WFH).** Data collection. Report on the WFH Annual Global Survey 2020. Québec, Canada: WFH; 2020. Acceso 12 de octubre de 2022. Disponible en <https://wfh.org/data-collection/>.
12. **Al-Rahal NK.** Inherited bleeding disorders in Iraq and consanguineous marriage. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 2018;12:273-281.
13. **Wang X, Tang N, Lu Y, Hu Q, Li D.** Two cases of von Willebrand disease type 3 in consanguineous Chinese families. *Mol Genet Genomic Med* 2020;8:e1075. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1075>.
14. **Borhany M, Pahore Z, Ul Qadr Z, Rehan M, Naz A, Khan A, et al.** Bleeding disorders in the tribe: result of consanguineous in breeding. *Orphanet J Rare Dis* 2010;5:23. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-23>.
15. **Stufano F, Baronciani L, Peyvandi F.** Diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand: Caracterización fenotípica. Québec, Canadá: Federación Mundial de Hemofilia (FMH); 2017. Acceso 31 de octubre de 2022. Disponible en <https://elearning.wfh.org/es/resource/diagnostico-de-la-enfermedad-de-von-willebrand-caracterizacion-fenotipica/>.
16. **Sadler B, Castaman G, O'Donnell JS.** von Willebrand disease and von Willebrand factor. *Haemophilia* 2022;28 Suppl 4:S11-17. <https://doi.org/10.1111/hae.14547>.
17. **Swami A, Kaur V.** von Willebrand disease: A concise review and update for the practicing physician. *Clin Appl Thromb Hemost* 2017;23:900-910. <https://doi.org/10.1177/1076029616675969>.
18. **Ledford-Kraemer MR.** Analysis of von Willebrand factor structure by multimer analysis. *Am J Hematol* 2010;85:510-514. <https://doi.org/10.1002/ajh.21739>.
19. **Zeng J, Shu Z, Liang Q, Zhang J, Wu W, Wang X, et al.** Structural basis of von Willebrand factor multimerization and tubular storage. *Blood* 2022;139:3314-3324. <https://doi.org/10.1182/blood.2021014729>.
20. **Laffan M, Sathar J, Johnsen JM.** von Willebrand disease: Diagnosis and treatment, treatment of women, and genomic approach to diagnosis. *Haemophilia* 2021;27:S66-74. <https://doi.org/10.1111/hae.14050>.
21. **Yee A, Kretz CA.** von Willebrand factor: form for function. *Semin Thromb Hemost* 2014;40:17-27.
22. **Stockschlaeder M, Schneppenheim R, Budde U.** Update on von Willebrand factor multimers: focus on high-molecular-weight multimers and their role in hemostasis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2014;25:206-216. <https://doi.org/10.1097/mbc.0000000000000065>.
23. **Leebeek FW, Eikenboom JC.** von Willebrand's disease. *N Engl J Med* 2016;375:2067-2080. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1601561>.
24. **Kovacevic KD, Grafeneder J, Schörgenhofer C, Gelbenegger G, Gager G, Firbas C, et al.** The von Willebrand factor A-1 domain binding aptamer BT200 elevates plasma levels of von Willebrand factor and factor VIII: a first-in-human trial. *Haemato-*

- logica 2022;107:2121-2132. <https://doi.org/10.3324/haematol.2021.279948>.
25. **Sharma R, Flood VH.** Advances in the diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Blood* 2017;130:2386-2391. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-05-782029>.
 26. **National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI).** The diagnosis, evaluation and management of von Willebrand Disease (full report). Bethesda, Estados Unidos,: NHLBI; 2007. Acceso 11 de octubre de 2022. Disponible en <https://www.nhlbi.nih.gov/resources/diagnosis-evaluation-and-management-von-willebrand-disease-full-report>.
 27. **Goodeve A.** Genetics of type 1 von Willebrand disease. *Curr Opin Hematol* 2007;14:444-449. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32826f4b41>.
 28. **Soto AV, Morales GM, Verdugo LP.** Empleo del DDAVP en el manejo de la enfermedad de von Willebrand. *Rev Chil Pediatr* 2005;76:193-197.
 29. **Ng CJ, Di Paola J.** von Willebrand disease: Diagnostic strategies and treatment options. *Pediatr Clin North Am* 2018;65:527-541. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2018.02.004>.
 30. **Kruse-Jarres R, Johnsen JM.** How I treat type 2B von Willebrand disease. *Blood* 2018;131:1292-1300. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-742692>.
 31. **Doruelo AL, Haberichter SL, Christopherson PA, Boggio LN, Gupta S, Lentz SR, et al.** Clinical and laboratory phenotype variability in type 2M von Willebrand disease. *J Thromb Haemost* 2017;15:1559-1566. <https://doi.org/10.1111/jth.13742>.
 32. **Seidizadeh O, Peyvandi F, Mannucci PM.** von Willebrand disease type 2N: An update. *J Thromb Haemost* 2021;19:909-916. <https://doi.org/10.1111/jth.15247>.
 33. **Castaman G.** How I treat von Willebrand disease. *Thromb Res* 2020;196:618-625. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2020.07.051>.
 34. **Makris M, Hermans C.** The 2021 von Willebrand disease guidelines: Clarity and controversy. *Haemophilia* 2022;28:1-3. <https://doi.org/10.1111/hae.14465>.
 35. **Lavin M, Christopherson P, Grabell J, Abshire T, Flood V, Haberichter SL, et al.** Longitudinal bleeding assessment in von Willebrand disease utilizing an interim bleeding score. *J Thromb Haemost* 2022;20:2246-2254. <https://doi.org/10.1111/jth.15807>.
 36. **Laffan MA, Lester W, O'Donnell JS, Will A, Tait RC, Goodeve A, et al.** The diagnosis and management of von Willebrand disease: a United Kingdom Haemophilia Centre Doctors Organization guideline approved by the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol* 2014;167:453-465. <https://doi.org/10.1111/bjh.13064>.
 37. **Nichols WL, Hultin MB, James AH, Manco-Johnson MJ, Montgomery RR, Ortel TL, et al.** 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2007.01643.x>.
 38. **Kalot MA, Husainat N, El Alayli A, Abughanimeh O, Diab O, Tayiem S, et al.** von Willebrand factor levels in the diagnosis of von Willebrand disease: a systematic review and meta-analysis. *Blood Adv* 2022;6:62-71. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021005430>.
 39. **Castaman G, Linari S.** Diagnosis and treatment of von Willebrand disease and rare bleeding disorders. *J Clin Med* 2017;6:45. <https://doi.org/10.3390/jcm6040045>.
 40. **Bowman ML, James PD.** Controversies in the diagnosis of type 1 von Willebrand disease. *Int J Lab Hematol* 2017;39 Suppl 1:61-68. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12653>.
 41. **Seidizadeh O, Baronciani L, Pagliari MT, Cozzi G, Colpani P, Cairo A, et al.** Phenotypic and genetic characterizations of the Milan cohort of von Willebrand disease type 2. *Blood Adv* 2022;6:4031-4040. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022007216>.
 42. **Practical-Haemostasis.com.** von Willebrand factor [VWF]: Introduction. Cambridge, UK: Sang Medicine Ltd; 2022. Acceso 11 de octubre de 2022. Disponible en https://practical-haemostasis.com/Factor%20Assays/vwf/vwf_assays_introduction.html.
 43. **Woods AI, Rossetti LC, Paiva J, De Brasi CD, Romero ML, Casinelli MM, et al.** Type 2N von Willebrand disease: Is it always a recessive

- trait? *Thromb Res* 2021;198:49-51. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2020.11.029>.
44. **Gritsch H, Stimpfl M, Turecek PL.** von Willebrand factor multimer analysis by low resolution SDS-agarose gel electrophoresis. *Bio Protoc* 2022;12:e4495. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4495>.
 45. **Saadalla A, Seheult J, Pruthi RK, Chen D.** von Willebrand factor multimer analysis and classification: A comprehensive review and updates. *Semin Thromb Hemost* 2022. [Epub ahead of print] Sep 29 de 2022. <https://doi.org/10.1055/s-0042-1757183>.
 46. **Favaloro EJ, Pasalic L, Curnow J.** Type 2M and type 2A von Willebrand disease: Similar but different. *Semin Thromb Hemost* 2016;42:483-497.
 47. **Hermans C, Batlle J.** Autosomal dominant von Willebrand disease type 2M. *Acta Haematol* 2009;121:139-144. <https://doi.org/10.1159/000214854>.
 48. **Frontroth JP, Favaloro EJ.** Ristocetin-induced platelet aggregation (RIPA) and RIPA mixing studies. *Methods Mol Biol* 2017;1646:473-494. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7196-1_35.
 49. **Fels S, Boeckelmann D, Glonnegger H, Büchchel M, Zieger B.** Novel Likely Pathogenic Variant in the A3 Domain of von Willebrand Factor Leading to a Collagen-Binding Defect. *Hamostaseologie* 2022. <https://doi.org/10.1055/a-1701-2181>.
 50. **Goodeve A.** Diagnosing von Willebrand disease: genetic analysis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2016;2016:678-682. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.678>.
 51. **Flood VH, Garcia J, Haberichter SL.** The role of genetics in the pathogenesis and diagnosis of type 1 von Willebrand disease. *Curr Opin Hematol* 2019;26:331-335. <https://doi.org/10.1097/moh.0000000000000524>.
 52. **Adil SN, Qureshi A.** von Willebrand disease- An under diagnosed entity. *J Pak Med Assoc* 2008;58:157-158.