

Enfoque diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand y hemofilia adquirida en nuestro país

Diagnostic approach of von Willebrand disease and acquired hemophilia in our country

Susana S. Meschengieser

*Departamento de Hemostasia y Trombosis
Instituto de Investigaciones Hematológicas
Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires*

su.meschengieser@gmail.com



Enfermedad de
Von Willebrand

HEMATOLOGÍA, Vol 19: 25 - 31
Número Extraordinario
XXII CONGRESO
Octubre 2015

Palabras clave: Enfermedad de von Willebrand, Hemofilia adquirida, Diagnóstico de laboratorio.

Keywords: von Willebrand disease, acquired hemophilia, laboratory diagnosis

Introducción

La enfermedad de von Willebrand (VWD) es la patología hemorrágica hereditaria autosómica más frecuente. Causa sangrado significativo en aproximadamente 1 de cada 1000 sujetos⁽¹⁾ aunque su prevalencia ha sido estimada entre 1% hasta 1 en 10000⁽²⁾. Afecta a ambos sexos por igual pero hay más mujeres diagnosticadas probablemente por el sangrado excesivo en la población femenina en edad reproductiva. No muestra preferencias por ninguna raza o zona geográfica específica.

La VWD es consecuencia de defectos cuantitativos y/o cualitativos del factor von Willebrand (VWF), una glicoproteína multimérica que se sintetiza en las células endoteliales y en los megacariocitos y cuya función es promover la adhesión de las plaquetas al subendotelio y la agregación, a través de su unión a

la glicoproteína Ib y al complejo IIb/IIIa así como al colágeno de la matriz subendotelial. El VWF, además, estabiliza el factor VIII en la circulación y lo protege de su degradación proteolítica. El sangrado en la VWD se explicaría por la dificultad en iniciar la adhesión al sitio de injuria y la formación del tapón plaquetario, así como por los niveles disminuidos de factor VIII.

La clasificación de la VWD ha sido básicamente la misma en los últimos 10 años. Existen 6 tipos diferentes: VWD1 y VWD3, deficiencias cuantitativas ya sea parcial (tipo 1) o total (tipo 3) y defectos cualitativos, VWD2A, 2B, 2M y 2N. El tipo 1, con una disminución leve a moderada de un VWF normal, constituye el 65 al 80% de los casos; el tipo 2 que agrupa a aquellos con VWF funcionalmente anor-

mal, se presenta en el 20 al 35% de los casos y el tipo 3, con ausencia completa del VWF, afecta alrededor de 1 por millón de habitantes.

La clasificación correcta de los diferentes tipos basada en parámetros clínicos y de laboratorio es muy importante para el manejo terapéutico de los pacientes.

Factor von Willebrand: estructura

El gen del VWF se localiza en el brazo corto del cromosoma 12 y está formado por 52 exones. Existe un pseudogen con replicación parcial en el cromosoma 22, que entorpece el análisis molecular. El exón 28 codifica sitios esenciales y es la región que presenta más mutaciones. El gen del VWF codifica la síntesis de un pre-pro-VWF de 2813 aminoácidos. Esta proteína sufre importantes modificaciones postranscripcionales. Primero la remoción del péptido señal, de 22 aminoácidos, luego la dimerización del pro-VWF a través de puentes disulfuro. Los dímeros son transportados desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi donde se forman los multímeros. El propéptido (VWFpp) es liberado por probable acción de la furina dando lugar al VWF maduro. Tanto el VWF como el VWFpp son liberados al plasma en relación 1:1. Luego de la multimerización el VWF es almacenado en los cuerpos de Weibel Palade de las células endoteliales y en los gránulos alfa de las plaquetas, de donde puede ser liberado por diversos estímulos.

El VWF almacenado así como el recién liberado tienen formas multiméricas extragrandes que son muy reactivas y se unen a la GPIb. El VWF liberado es clivado por una metaloproteasa, ADAMTS 13, en el dominio A2. Hay dos tipos de secreción del VWF desde las células endoteliales: 1) constitutiva y 2) regulada. Cuando aumenta el nivel del VWF plasmático, también aumenta el factor VIII pero no se sabe si esta asociación se produce dentro o fuera de la célula endotelial.

El VWF tiene una vida media de 8 a 12 horas y el propéptido 2 a 3 horas. El grupo sanguíneo O favorecería la depuración del VWF; los portadores de grupo O tienen niveles 20 a 30% menores de VWF.

Diagnóstico clínico y de laboratorio

Según Federici⁽³⁾ se necesitan tres criterios para realizar un diagnóstico correcto de VWD:

- 1) historia personal de sangrado desde la infancia
- 2) disminución de la actividad del VWF en plasma

- 3) historia familiar de sangrado, para poder establecer si la herencia es dominante o recesiva.

Con respecto al laboratorio tenemos pruebas de 1er nivel que incluyen: VWF:RCo (cofactor de ristocetina) u otra prueba que explore la interacción VWF/GPIb, VWF:Ag, factor VIII y aglutinación con ristocetina (RIPA) y pruebas de 2do nivel como la determinación de la estructura multimérica, del propéptido (VWFpp), la respuesta a la infusión de desmopresina, la unión del factor VIII (VWF:FVIII) y la unión al colágeno (VWF:CB). El diagnóstico molecular resulta útil para confirmar defectos específicos, especialmente en los VWD tipo 2 como los 2A, 2B, 2N y 2M ya que las mutaciones están agrupadas en exones específicos del gen del VWF. La probabilidad de encontrar mutaciones en el tipo 1 es más alta solo en aquellos con valores de VWF por debajo de 30U/dl.

Historia clínica

Los síntomas más frecuentes son sangrado mucocutáneo excesivo, como epistaxis, equimosis fáciles, sangrado post extracción dentaria o post cirugías y menorragia en las mujeres. Los desafíos quirúrgicos más importantes que ponen de manifiesto la tendencia hemorrágica son la amigdalectomía, adenoidectomía, cirugía de nariz, cirugía de mama, de cuello uterino y las cesáreas. El sangrado suele ser inmediato pero a veces es demorado, como en los trastornos fibrinolíticos. El sangrado post parto es poco frecuente en los casos leves y puede ser inmediato (hemorragia post parto primaria) o luego de varios días (hemorragia post parto secundaria). Las hemartrosis son excepcionales, salvo en el VWD tipo 3, que se comporta como la hemofilia. Síntomas como hematuria, sangrado digestivo o hemorragia cerebral no podrían ser explicados solo por la enfermedad de von Willebrand.

El sangrado es generalmente leve a moderado en el VWD tipo 1 y suele ser más severo en los 2A, 2B y 2M. No hay una correlación clara entre los síntomas y los niveles del factor VWF. Para evaluar el sangrado de una manera más objetiva se han utilizado los "bleeding scores" (BS) o scores de sangrado. Tossetto y col.⁽⁴⁾ desarrollaron un BS para confirmar el diagnóstico de VWD y para evaluar la tendencia al sangrado. La Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia ha recomendado el uso de otra herramienta para poder cuantificar la severidad del san-

grado, el ISTH-BAT⁽⁵⁾.

El ISTH-BAT es utilizado ampliamente y se ha visto una buena correlación entre los subtipos de VWD, los niveles de VWF y el score^(4,6). Estos scores no serían aplicables en niños ya que la población pediátrica ha tenido, en general, menos desafíos hemostáticos y en esos casos la historia familiar adquiere mayor relevancia

Los pacientes con VWD pueden ser clasificados según los niveles basales de VWF:RCo en leves (31-56UI/dl), moderados (10-30 UI/dl) y severos (<10UI/dl). El BS muestra en general una correlación inversa con los niveles basales de VWF:RCo.

VWD tipo 1

Abarca el 65 al 75% de los casos en la mayoría de las series. Su fenotipo es muy heterogéneo con niveles de VWF que oscilan entre 5 y 40% según el defecto molecular. En este tipo de VWD los niveles de VWF:RCo y VWF:Ag son concordantes. La herencia es autosómica dominante y se han detectado mutaciones en alrededor del 65% de los casos. A mayor severidad, mayor es la posibilidad de encontrar una mutación. Los mecanismos fisiopatológicos que resultan de la mutación incluyen un amplio rango de funciones alteradas como transcripción defectuosa, "splicing" aberrante, anomalías en el depósito y secreción y depuración o "clearance" acelerado. El grupo sanguíneo O es más prevalente en este tipo de VWD. En el grupo de pacientes sin mutación detectable en el locus del VWF es posible que los bajos niveles de VWF resulten de modificadores externos. En la variante Vicenza (VWDVicenza) hay mayor velocidad de depuración.

El tipo 1 leve es el que presenta más dificultades para el diagnóstico por su penetrancia variable.

VWD tipo 2

Es una anomalía cualitativa. Constituye el 20 al 30% de los casos. Suelen ser más sintomáticos.

VWD2A

Existe una discordancia entre los niveles antigénicos y funcionales del VWF, el cociente VWF:RCo/VWF:Ag es menor a 0.6, con ausencia de los multímeros grandes e intermedios. Hay dos tipos de VWD2A: uno resulta de la retención intracelular y el otro, más frecuente, es producto de proteólisis con pérdida de los multímeros grandes en la circulación. La mayoría de las mutaciones se localizan en el exón 28, en los dominios A2 y A1⁽⁷⁾. La herencia

suele ser dominante aunque hay mutaciones en el dominio D2 que son recesivas y se expresan en el homocigoto o en el doble heterocigoto.

VWD2B

En esta variante, existe una ganancia de función del VWF en su interacción con la GPIb. Se producirían agregados VWF-plaquetas, con trombocitopenia resultante y pérdida de los multímeros grandes. La trombocitopenia puede ser leve, moderada o no presentarse inicialmente. Situaciones como el embarazo, infecciones o la exposición a la desmopresina pueden hacer aparecer la trombocitopenia que no estaba presente anteriormente. El cociente VWF:RCo/VWF:Ag también es <0.6. Para el diagnóstico es fundamental la prueba de agregación con ristocetina en baja concentración (<0.8mg/mL). La herencia es dominante y las mutaciones están situadas en el exón 28. El fenotipo es similar al del pseudo-von Willebrand o von Willebrand plaquetario pero en este caso la alteración está en el receptor plaquetario, GPIb α , que presenta mayor avidéz por el VWF plasmático. Como el patrón plasmático es similar en ambas patologías se requieren pruebas de mezcla con plasma y plaquetas normales para establecer si el problema es plasmático o plaquetario⁽⁸⁾. En el caso del VWD plaquetario las plaquetas pueden agregar en presencia de crioprecipitado o concentrado de VWF sin ristocetina⁽⁹⁾.

VWD2M

Hay discordancia entre el VWF:RCo y el VWF:Ag (<0.6) pero los multímeros son normales. Habría una alteración en la interacción con las plaquetas. Las mutaciones se localizan en el exón 28, generalmente en el dominio A1 pero hay también algunos casos con mutaciones en A3, exones 30-31, con defecto en la unión al colágeno.

VWD2N

En esta variante está afectada la unión al factor VIII. Los niveles de VWF son normales, salvo en heterocigotos compuestos. El factor VIII está disminuido como en la hemofilia A leve, con valores entre 5 y 40%⁽¹⁰⁾ y un cociente FVIII:C/VWF:Ag <1. El diagnóstico diferencial es fundamental por la terapéutica, ya que el tipo 2N no va a responder al concentrado de Factor VIII sino al de von Willebrand. El diagnóstico se basa en la unión al FVIII. La herencia es autosómica recesiva, los heterocigotos suelen ser asintomáticos. Las mutaciones se sitúan

en los exones 18 a 20 (dominio D⁷/D3) pero también pueden estar en el sitio de clivaje por la furina para la remoción del propéptido. Si no se encuentran mutaciones en estos exones habría que buscar alteraciones en el gen del factor VIII ⁽¹¹⁾.

VWD3

El VWF es indetectable. El factor VIII es muy bajo (1-5U/dL). La herencia suele ser autonómica recesiva, homocigotos en casos de consanguinidad o dobles heterocigotos. El sangrado es severo y de aparición temprana y puede haber hemartrosis como en la hemofilia. Las mutaciones pueden estar a todo lo largo del gen del VWF.

Pruebas diagnósticas

Ante la sospecha clínica se deben solicitar las pruebas de laboratorio que nos van a permitir arribar a un diagnóstico. Como los síntomas de la VWD son similares a los de las trombocitopatías, se deben incluir en el estudio las pruebas de función plaquetaria. El VWF puede fluctuar y en las formas leves los valores pueden normalizarse ante cuadros inflamatorios, infecciosos, en el embarazo, con la ingesta de anticonceptivos orales o con el ejercicio. En niños pequeños el estrés puede también modificar los resultados. Por lo tanto, muchas veces es necesario repetir el estudio antes de descartar el diagnóstico. El tiempo de sangría no siempre está prolongado, es poco reproducible y puede ser normal en las formas leves, por lo que tiene una utilidad limitada. El uso del PFA-100 (platelet function analyzer) permite una evaluación rápida en sangre entera de la actividad plaquetaria von Willebrand dependiente, pero serviría solo como "screening" y no como herramienta diagnóstica⁽³⁾.

Pruebas de primer nivel

- Factor VIII
- VWF:Ag (antígeno plasmático)
- VWF:RCo (cofactor de ristocetina)

Factor VIII

En pacientes con VWD 2A, 2B y 2M el factor VIII suele ser normal. El VWF es el transportador y estabilizador del factor VIII, y el cociente FVIII:C/VWF:Ag normal es 1. Un cociente FVIII:C/VWF:Ag >1 sugiere VWD1 y <1 sugiere VWD2N.

VWF:Ag

Se utilizan anticuerpos anti-VWF. Originalmente se utilizaba el método de Laurell pero actualmente se

prefiere el ensayo inmunoenzimático (ELISA) de mayor sensibilidad. También se puede utilizar un método inmunoturbidimétrico (LIA) menos sensible.

VWF:RCo

El cofactor de ristocetina es el método standard para medir la actividad del VWF. Se basa en la propiedad de un antibiótico, la ristocetina, de aglutinar plaquetas frescas o fijadas en presencia del VWF que interacciona con la GPIb plaquetaria. El método no es muy sensible y no resulta confiable por debajo de 15U/dL. Es poco reproducible con un coeficiente de variación del 8 al 15%. También puede utilizarse un ELISA con GPIb derivada del plasma o recombinante con mayor sensibilidad y menor coeficiente de variación. Hay ensayos automatizados de unión VWF-GPIb sin presencia de ristocetina con resultados promisorios⁽¹²⁾.

Agregación con ristocetina (RIPA)

Se utilizan en principio dos concentraciones de ristocetina, 1,2mg/mL y 0,7 mg/mL. Evalúa el VWF plasmático y la función de la GPIb. En el VWD 3 la agregación con ristocetina (1,2) suele estar ausente o disminuida. Pero no siempre coincide el valor del VWF con el resultado de la agregación ya que la prueba es poco sensible. La agregación con dosis bajas de ristocetina (<0,8mg/dL) se utiliza para la detección del VWD2B que presenta hiperrespuesta por ganancia de función del VWF. También se observa hiperagregación en el von Willebrand plaquetario. Cuando se observa hiperagregación con ristocetina, es importante descartar que el paciente no hiperagregue con otros agonistas como ADP, por ejemplo. La hiperagregación no debe ser global sino exclusiva con ristocetina.

Pruebas de segundo nivel

Estudio de multímeros

La estructura multimérica puede ser analizada por electroforesis en gel de agarosa de baja o alta resolución. Los multímeros pueden ser de bajo, intermedio o alto peso molecular. El estudio de los multímeros es útil para el diagnóstico de los tipos 2A, 2B y 2M pero no sirven para hacer diagnóstico de VWD que no se haya realizado previamente con las determinaciones clásicas. En el VWD1, VWD2M y VWD2N todos los multímeros están presentes. En el VWD2A faltan los multímeros de peso alto e intermedios. En el VWD2B faltan los multímeros de alto peso mole-

cular en la mayoría de los casos, aunque hay casos con multímeros relativamente normales

Unión al colágeno (VWF:CB)

Es un ensayo sensible a la ausencia de los multímeros grandes. Puede resultar una alternativa para distinguir entre VWD2A y 2M utilizando el cociente VWF:CB/Ag en reemplazo del estudio multimérico⁽¹³⁾. En algunos escasos pacientes con mutaciones en el dominio A3 con VWF:RCo normal y multímeros normales, el VWF:CB es anormal. No es claro cuándo se justificaría realizar esta prueba; se podría incluir en aquellos casos con historia de sangrado que quedan sin diagnóstico.

Unión al factor VIII (VWF:FVIII)

Permite el diagnóstico del VWD2N para diferenciarlo de la hemofilia A. La técnica presenta dificultades, es poco reproducible.

Própeptido (VWFpp)

El VWFpp y el VWF unidos en forma no covalente están depositados en los gránulos alfa de las plaquetas y megacariocitos y en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales. En plasma se disocian y circulan en forma independiente, con distinta vida media. El cociente VWFpp/VWF:Ag >1 permitiría identificar pacientes VWD1 con sobrevida acortada y también sería útil para el diagnóstico de VWD adquirido^(14, 15).

Respuesta a la desmopresina

Desde el lado clínico es muy importante verificar que el paciente responde adecuadamente a la desmopresina, que corrige fundamentalmente el valor del factor VIII y del VWF:RCo y que esta corrección dura por lo menos dos horas, que es la duración

promedio de las cirugías habituales. En general los VWD1 responden pero puede haber respuesta transitoria en aquellos con depuración acelerada. En el VWD2A el VWF:RCo suele no aumentar y en el VWD2B puede empeorar la trombocitopenia, Pero se aconseja hacer la prueba igual antes de descartar el beneficio de la desmopresina. En el VWD2N la respuesta es variable y el VWD3 no responde. No conviene evaluar la respuesta en niños a menos que el paciente requiera una cirugía.

Estudio genético

La utilidad del diagnóstico genético es manifiesta en los VWD tipo 2, especialmente cuando el fenotipo es confuso. En cambio, no se justifica el estudio genético en el VWD1 considerando que solo en el 35% de los casos habrá una mutación “candidata”⁽¹⁶⁾. Cuando el VWF:Ag es <20UI/dL es más probable encontrar una variación en la secuencia⁽¹⁷⁾.

Anti-VWF

Hay anticuerpos que inhiben el VWF y pueden detectarse en pruebas de mezcla con plasma normal. Son de utilidad en aquellos pacientes en tratamiento profiláctico con concentrados de FVIII/VWF con respuesta clínicamente inadecuada.

Diagnóstico de VWD en Argentina

En nuestro país estamos en condiciones de realizar todas las pruebas descriptas anteriormente. No todos los centros cuentan con todos estos recursos por lo que muchas veces es necesario derivar al paciente a instituciones que puedan completar estudios como el análisis de los multímeros y la biología molecular. El estudio genético solo se realiza en las variantes del tipo 2 y en el VWD plaquetario⁽¹⁸⁾.

Tabla 1	
Pruebas de laboratorio para diagnóstico de VWD	
Primer nivel	
- Factor VIII (FVIII:C)	
- VWF:RCo (Cofactor de ristocetina) o pruebas que exploran interacción VWF-GPIb	
- VWF:Ag (Antígeno de VW)	
- Aglutinación inducida por ristocetina (RIPA)	
Segundo nivel	
- Prueba de respuesta a la desmopresina	
- Estudio de multímeros en geles de alta y baja resolución	
- VWFpp (propéptido)	
- VWF:FVIII (unión al factor VIII)	
- VWF:CB (unión al colágeno)	
- Biología molecular	

Diagnóstico de hemofilia adquirida

La hemofilia adquirida (HA) es una patología autoinmune que resulta de la aparición de un anticuerpo anti factor VIII. Se presenta con sangrado severo en un individuo sin antecedentes previos de sangrado. El sangrado puede poner en peligro la vida del paciente o afectar la viabilidad de alguno de los miembros. Es una patología poco frecuente, afecta 1 a 2 casos por millón de habitantes. La incidencia aumenta con la edad; en mayores de 85 años se presenta en 14.7/millón/año⁽¹⁹⁾. Es muy rara en niños. Hay una distribución bimodal, con un pico entre los 20 y 30 años y otro entre los 68 y 80 años. El pequeño grupo de menor edad corresponde a mujeres que desarrollan el inhibidor periparto. En la mitad de los casos la aparición es espontánea. Entre las patologías subyacentes además del post-parto, se encuentran los desordenes autoinmunes, neoplasias, enfermedades linfoproliferativas, drogas. Los inhibidores que aparecen en relación con el embarazo, son más frecuentes en los primeros cuatro meses post parto y hasta un año después, aunque también hay casos anteparto. Pueden presentar remisión espontánea⁽²⁰⁾. Los anticuerpos son Ig G policlonales, predominantemente Ig G1 e Ig G4. Reaccionan con los dominios A2, A3 o C3 del factor VIII y bloquean la interacción del factor VIII con el factor IX, los fosfolípidos y el VWF. El sangrado es severo, hay hematomas musculares, retroperitoneales pero no hemartrosis a diferencia de la hemofilia hereditaria.

Diagnóstico de laboratorio (Tabla 2)

El tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA) está prolongado y no corrige en la mezcla con plasma normal. Estos anticuerpos son tiempo y temperatura dependientes, las mezclas con plasma normal deben ser incubadas 2 horas a 37°. El factor VIII está disminuido y aunque los factores IX, XI y XII también pueden estar disminuidos, el descenso del factor VIII es mucho más marcado. En cambio, en el inhibidor lúpico, todos los factores de mecanismo intrínseco están parejamente descendidos. A diferencia de los pacientes con hemofilia e inhibidor, en la hemofilia adquirida hay factor VIII residual. Hay dos tipos de cinética en los inhibidores de FVIII: tipo 1: de 1er orden, con relación lineal entre el FVIII residual y la concentración del anticuerpo, propio de la hemofilia congénita y tipo 2: de segundo orden con inactivación incompleta del FVIII, característico de la forma autoinmune. El título del inhibidor se determina por el método Bethesda. Una unidad Bethesda es la cantidad de anticuerpo que neutraliza el 50% del factor VIII de un pool de plasma normal luego de 2 horas a 37°. El plasma del paciente se incuba con plasma normal, con diluciones crecientes del paciente hasta llegar a un 50% de FVIII. La inversa de la dilución da el valor de las unidades Bethesda⁽²¹⁾. Para el diagnóstico de esta patología el aspecto clínico es fundamental. Sangrado severo de comienzo brusco sin historia previa de hemorragia asociado a TTPA prolongado que no corrige con plasma normal deben orientar hacia la búsqueda del inhibidor de FVIII. El diagnóstico temprano mejora claramente el pronóstico .

Tabla 2**Diagnóstico de hemofilia adquirida**

- Paciente con sangrado severo sin historia previa de hemorragia
- TTPA muy prolongado, que no corrige con el agregado de plasma normal y es tiempo-temperatura dependiente (potencia con la incubación de 2 horas a 37°)
- Factor VIII mucho más disminuido que el resto de los factores de vía intrínseca

Declaración de conflictos de interés:

He recibido honorarios de parte de [Novo Nordisk por concepto de conferencias y actividades educativas en las que ha participado.

Bibliografía

1. Bowman M, Hopman WM, Rapson D, et al. The prevalence of symptomatic von Willebrand disease in primary care practice. *J Thromb Haemost* 2010; 8:213-216.

2. Bloom AL. von Willebrand factor: clinical features of inherited and acquired disorders. *Mayo Clin Proc.* 1991; 66:743-751.
3. Federici AB. Clinical and laboratory diagnosis of VWD. *Hematology Am Soc Hematol Edu Program.* 2014;2014:524-530
4. Tossetto A, Rodeghiero F, Castaman G, et al. A quantitative analysis of bleeding symptoms in type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study (MCMDM-1 VWD). *J Thromb Haemost* 2006;4:766-773
5. Rodeghiero F, Tossetto A, Abshire T, et al. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *J Thromb Haemost* 2010;8:2063-65
6. Bowman M, Mundell G, Grabell J, et al. Generation and validation of the Condensed MCMDM-1VWD bleeding questionnaire for von Willebrand disease. *J Thromb Haemost* 2008;6:2062-66
7. Goodeve AC. The genetic basis of von Willebrand disease. *Blood Reviews* 2010;24:123-134
8. Favaloro EJ, Patterson D, Denholm A, et al. Differential identification of a rare form of platelet-type(pseudo) von Willebrand disease (VWD) from Type 2 B VWD using a simplified ristocetin-induced-platelet-agglutination mixing assay and confirmed by genetic analysis. *Br J Haematol* 2007; 139:623-6
9. Othman M. Platelet-type Von Willebrand disease: Three decades in the life of a rare bleeding disorder. *Blood Reviews* 2011;25:147-53
10. Mazurier C, Goudemand J, Hilbert L, et al. Type 2N von Willebrand disease: clinical manifestations, pathophysiology, laboratory diagnosis and molecular biology. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2001;14:337-347
11. Goodeve AC, Rosén S, Verbruggen B. Haemophilia A and von Willebrand's disease. *Haemophilia* 2010; 16(suppl5): 79-84
12. Flood VH, Gill JC, Morateck PA, et al. Gain-of-function GPIb ELISA assay for the molecular and clinical biology of VWD. *Blood* 2011
13. Favaloro EJ. Collagen binding assay for von Willebrand factor (VWF:CBA): detection of von Willebrand's disease (VWD) and discrimination of VWD subtypes depends on collagen source. *Thromb Haemost* 2000;83:127-135
14. Haberichter SL, Castaman G, Budde U, et al. Identification of type 1 von Willebrand disease patients with reduced von Willebrand factor survival by assay of the VWF propeptide in the European study: molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 VWD (MCMDM-1VWD). *Blood* 2008;111:4979-4985
15. Eikenboom J, Federici AB, Dirven RJ, et al. VWF pro peptide and FVIII in the characterization of type 1 von Willebrand disease. *Blood* 2013;121:2336-2339
16. Lillicrap D. von Willebrand disease: advances in pathogenetic understanding, diagnosis and therapy. *Blood* 2013;122: 254-260
17. Flood VH. New insights into genotype and phenotype of VWD. *Hematology Am Soc Hematol Edu Program.* 2014;2014:531-535
18. Woods AI, Sánchez Luceros A, Meschengieser SS, et al. Diagnosis and management of von Willebrand disease in a single institution in Argentina. *Semin Thromb Hemost* 2011;37:856-8
19. Franchini M, Mannucci PM. Acquired haemophilia A: a 2013 update. *Thromb Haemost* 2013;110:1114-20
20. Collins PW, Percy CL. Advances in the understanding of acquired haemophilia A: implications for clinical practice. *Br J Haematol* 2010;148:183-94
21. Kasper CK, Aledort L, Aronson D, et al. A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh* 1975;34:869-72