

**ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND.
REVISION**

María Díez-Ewald y Gilberto Vizcaíno

*Instituto de Investigaciones Clínicas. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia.
Apartado Postal 1151. Maracaibo 4001-A. Venezuela.*

RESUMEN

La enfermedad de von Willebrand (EvW) es una entidad clínica de tipo hereditario, generalmente de carácter autosómico dominante, que se caracteriza por sangramiento mucocutáneo, tiempo de sangría alargado y alteraciones cuantitativas o cualitativas del factor von Willebrand (FvW). Este factor se encuentra en el plasma formando un complejo con el factor VIII de la coagulación (FVIII).

Al FvW le corresponde aproximadamente el 95% de la masa del complejo FVIII/FvW, con un peso molecular que oscila entre 440×10^3 y 20×10^6 . Estructuralmente está compuesto por una serie de multímeros. El menor multímero circulante o protómero tiene un peso de 440.000, el próximo 880.000 y así sucesivamente. Mediante electroforesis en gel de agarosa y dodecil sulfato, se observa que cada multímero está compuesto por una banda central más ancha y 2 bandas satélites (tripleta).

El FvW sirve de puente entre plaquetas y estructuras subendoteliales entre ellas colágeno, favoreciendo de

este modo la adhesividad plaquetaria. La interacción FvW-plaquetas se realiza a través de receptores plaquetarios para este factor, estos receptores parecen estar situados en la glicoproteína Ib de la membrana plaquetaria y esta actividad se puede poner de manifiesto, *in vitro*, mediante el antibiótico ristocetina, el cual aglutina plaquetas normales lavadas, en presencia de FvW ya sea del plasma, crioprecipitado o FvW purificado (cofactor ristocetina). Los sitios funcionales de la molécula de FvW que interaccionan con las plaquetas, parecen encontrarse en una estructura mínima secundaria o terciaria, con una secuencia dada de aminoácidos y un peso molecular entre 52.000 y 58.000 Daltons.

Existe evidencia considerable de que el FvW media la adhesión de las plaquetas a fibrillas de colágeno subendoteliales, y se ha demostrado *in vitro*, que esta adhesión se cumple con todos los tipos de colágeno (I, II, III, IV y V), siempre que mantenga la estructura cuaternaria del colágeno y se encuentre bajo la forma fibrilar; por parte del FvW es necesario que estén presentes los grandes multímeros. El dominio funcional para la interacción FvW-colágeno, también parece residir en una pequeña estructura de aproximadamente 58.000 Daltons, lo que hace suponer que hubiera una misma estructura en el FvW que sirve de enlace entre las plaquetas y el subendotelio.

La EvW se ha clasificado de acuerdo a las modificaciones cuantitativas y estructurales del FvW en: von Willebrand tipo I donde hay disminución proporcional de los multímeros grandes, medianos y pequeños en plasma y plaquetas. Von Willebrand tipo II, el cual tiene el subtipo IIA, donde están ausentes los multímeros grandes en plasma y plaquetas, y el subtipo IIB con multímeros grandes ausentes en plasma y presentes en plaquetas, en el subtipo IIB se ha descrito otra variante, el tipo IIB Tampa, que cursa con trombocitopenia crónica y agregación plaquetaria espontánea. El von Willebrand tipo III, constituye la forma más severa de la EvW, donde el FvW es indetectable. Se piensa que es la forma homocigota del von Willebrand tipo I y se hereda a través de un gen autosómico recesivo. Existen otros subtipos como el IA, IB, IC, IIC y IID, que son variantes de los

ya descritos. Además existe la pseudo enfermedad de von Willebrand o von Willebrand de tipo plaquetario, en esta enfermedad no hay alteraciones de la molécula del FvW, sino que existe un defecto a nivel de los receptores de la membrana plaquetaria, que aparentemente poseen gran afinidad por los multímeros de mayor peso molecular del plasma, esto ocasiona que el FvW circulante tenga un déficit de esos grandes multímeros, mientras que su contenido es normal en las plaquetas.

Se ha descrito una forma adquirida de EvW, la cual aparece generalmente acompañando a procesos linfó y mieloproliferativos o a enfermedades de tipo autoinmune.

En varios casos se ha detectado la presencia de anticuerpos que neutralizan la actividad del FVIII e inhiben el cofactor ristocetina, la mayoría de estos anticuerpos son IgG o IgM, aunque también hay casos donde el anticuerpo es IgA. En algunos desórdenes linfó y mieloproliferativos se observa la desaparición en el plasma, de los multímeros grandes del FvW, anomalía que se corrige con la quimioterapia específica y con la administración de 1-amino-8D arginina-8D vasopresina (DDAVP).

La EvW con frecuencia se encuentra asociada a otras enfermedades hereditarias del tejido conjuntivo, tales como prolapso de válvula mitral, telangiectasia hemorrágica hereditaria y anemia drepanocítica.

La severidad de las manifestaciones clínicas de la EvW depende de la severidad de la alteración del complejo FVIII/FvW. Si el defecto es solo cuantitativo, cuanto más deficiente sea el FvW mayor será la deficiencia del FVIII y al tiempo de sangría prolongado se le suma el defecto de la coagulación. Si el defecto del FvW no es cuantitativo sino estructural, puede haber manifestaciones clínicas severas con niveles de FVIII y FvW normales.

Para hacer el diagnóstico de la EvW, además de los criterios clínicos y el tiempo de sangría alargado son necesarios, la cuantificación y el estudio cualitativo del FvW, mediante procedimientos inmunoelectroforéticos,

inmunoenzimáticos, radiométricos y electroforesis en dodecil-sulfato de sodio y gel de poliacrilamida o agarosa.

La EvW tiende a disminuir sus manifestaciones clínicas con la edad del paciente, sin embargo la edad fértil de la mujer tiende a ser muy problemática por la frecuencia de meno-metrorragias. Durante el embarazo el complejo FVIII/FvW aumenta, lo mismo que con el uso de estrógenos, por lo que las manifestaciones de la EvW tipo I disminuyen, bajo estas condiciones.

La terapia más efectiva para esta enfermedad, es la terapia sustitutiva, bajo la forma de crioprecipitado de plasma fresco. En la EvW tipo I de moderada severidad, da buenos resultados el uso de DDAVP previo a procedimientos quirúrgicos, ya que la inyección de este derivado de la vasopresina, produce liberación del FvW de los depósitos, con aumento de la concentración del FvW plasmático hasta 3 veces con respecto a los niveles basales. El tratamiento con DDAVP en pacientes con FvW tipo IIA no tiene efecto, porque el FvW que se libera al plasma mantiene el defecto estructural, tampoco tiene efecto en la EvW tipo III porque no hay FvW en los depósitos, y está contraindicado en la EvW tipo IIB y en el tipo plaquetario, ya que ocasiona activación plaquetaria con liberación de los grandes multímeros de FvW contenidos en los gránulos α de las plaquetas, ocasionando agregación plaquetaria intravascular y formación de trombos.

INTRODUCCION

La enfermedad de von Willebrand fue descrita por primera vez hace 6 décadas, por Eric von Willebrand, quien calificó con el término de Pseudohemofilia a una diátesis hemorrágica caracterizada por tiempo de sangría prolongado, conteo plaquetario y tiempo de coagulación normales y aumento de la fragilidad vascular. La enfermedad se presentaba en forma hereditaria, no ligada al sexo y con características dominantes, manifestaciones clínicas tales como equimosis espontáneas, epistaxis, menorragias y sangramiento excesivo después de extracción dental (147). Con el correr del tiempo la enfermedad recibió el nombre de su descubridor. La descripción inicial de la enfermedad sigue vigente, sin embargo mucho se ha avan-

zado con el conocimiento de su fisiopatología y de los mecanismos de la hemostasis. Hoy en día se sabe que ésta es una enfermedad de herencia autosómica dominante en la mayoría de los casos, con anomalías cualitativas o cuantitativas del factor von Willebrand (FvW). Esta enfermedad es la más frecuente entre los trastornos hereditarios por defectos plasmáticos. Ha sido reportada en todo el mundo y León en 1963 (67), describió los 5 primeros casos en Venezuela, tres de ellos pertenecientes a una misma familia.

Nos dedicaremos primordialmente a la descripción de este factor desde el punto de vista de su estructura y función.

Factor von Willebrand.—

El factor von Willebrand es una glicoproteína que circula en plasma unida al factor VIII de la coagulación, o factor antihemofílico (156), formando un complejo conocido como FVIII/FvW. El 95% aproximadamente de la masa de este complejo, corresponde a la molécula del FvW, de ahí que las propiedades físicas del complejo sean prácticamente las de este factor. El FvW purificado está compuesto por una serie de multímeros o polímeros cuyos pesos oscilan entre 400.000 y 20 millones de Daltons. El menor multímero circulante o protómero es un homodímero de peso molecular de 440.000 (71, 149) que representaría el intervalo de pesos moleculares entre multímeros adyacentes, de esta manera el próximo multímero sería de un peso molecular de 880.000 (105, 107). Mediante electroforesis en agarosa y gel de poliacrilamida, se ha observado que cada multímero está compuesto por lo menos de 3 miembros, representados en la electroforesis por 3 bandas, donde predomina la central (110).

Papel de los carbohidratos en la función del FvW.—

En la búsqueda de los sitios funcionales del FvW se le ha dado mucha importancia al papel de los carbohidratos. Mediante métodos enzimáticos, utilizando neuraminidasa, se puede extraer el ácido siálico terminal y estudiar el comportamiento de este asialo von Willebrand. Kao y col (60) encontraron que la extracción del ácido siálico terminal causaba una menor afinidad del FvW por los sitios de unión de las plaquetas, cuando se añadía ristocetina. Sin embargo trabajos posteriores demostraron que el asialo vW tiene una mayor afinidad con las plaquetas y es más, induce la aglutinación de éstas, aún sin la adición de ristocetina o de otro estímulo (23, 146). Recientemente los estudios de Goudemand y col (40) apoyan estos resultados, demostrando que el asialo FVIII/FvW retiene su actividad aglutinante de plaquetas con ristocetina y trombina, y que la estructura multimérica del FvW se mantiene intacta.

El asialo vW interacciona con sitios específicos de unión en la superficie plaquetaria, estos sitios de unión están disminuidos en la enfermedad de Bernard-Soulier, pero en cantidades normales en la tromboastenia de Glanzmann, lo que implica que la glicoproteína Ib (GPIb) es el sitio de unión para el FvW desprovisto de ácido siálico (13, 40). De Marco y col (24) han demostrado que la interacción inicial de asialo FvW a plaquetas, es mediada por GPIb, y esto va acompañado de liberación del contenido de los gránulos densos, y la fijación subsecuente mediada por ADP, de fibrinógeno a los receptores en el complejo de glicoproteínas IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) y agregación plaquetaria. Si la interacción inicial se bloqueaba con anticuerpos monoclonales anti GPIb, se abolía la agregación inducida por el asialo FvW; si el anticuerpo monoclonal iba dirigido al complejo GPIIb/IIIa, no se bloqueaba la unión de asialo FvW a las plaquetas, pero se inhibía la unión subsecuente de fibrinógeno, por lo tanto tampoco se producía la agregación, sugiriendo que el asialo FvW actúa como un agonista plaquetario una vez que se ha fijado a la GPIb.

También se ha sugerido que los residuos de la penúltima galactosa, tienen gran importancia en la aglutinación de las plaquetas con ristocetina. La oxidación o extracción de esta galactosa, disminuye la aglutinación plaquetaria y ésta se restituye, si se reducen los residuos de galactosa previamente oxidados (41, 60). Al tratar el FvW con galactosidasa se desprende el 20% de la galactosa (agalacto-FVIII/FvW), mientras que si se trata el asialo FVIII/FvW, se desprende el 55% de la galactosa (asialo-agalacto FVIII/FvW). Tanto el agalacto como el asialo-agalacto FVIII/FvW son incapaces de aglutinar plaquetas normales en presencia de ristocetina, pero si las aglutinan en presencia de trombina (39). Este efecto se debe a la desagregación de multímeros grandes (43) y a aumento de los multímeros más pequeños.

Resultados recientes demuestran que la extracción de ácido siálico y galactosa terminal, hacen al FvW muy susceptible a la acción de proteasas, entre ellas la plasmina, pero si durante el tratamiento con neuraminidasa o B-galactosidasa se utiliza una mezcla de inhibidores de la proteólisis, se puede extraer hasta el 80% de la galactosa, sin pérdida significativa de los grandes multímeros o de la actividad de ristocetina (31, 115).

Factor von Willebrand plaquetario.—

Las plaquetas contienen aproximadamente el 20% del FvW total (51, 92, 156) pero no tienen actividad procoagulante del factor VIII (10, 51, 79, 92, 107). La principal diferencia del FvW plaquetario con el FvW plasmático es que el primero, posee multímeros más grandes y por consiguiente tiene peso molecular más alto (69, 111) lo cual pudiese tener significado

funcional, ya que es conocido que los multímeros más grandes tienen más importancia en la hemostasis (156), sin embargo no hay diferencias en la composición de las subunidades o en su estructura peptídica (94).

La mayor proporción del FvW se encuentra almacenada en los gránulos α de las plaquetas y una porción mucho más pequeña, después del fraccionamiento subcelular puede encontrarse en la membrana (38, 157). Los estudios con inmunofluorescencia muestran que los anticuerpos anti FvW solo se colorean en plaquetas estimuladas, lo que hace suponer que el FvW no está expuesto en la plaqueta en reposo. Sin embargo, utilizando anticuerpos radioactivos se ha podido demostrar el FvW aún en las membranas de las plaquetas en reposo (113, 128).

Cuando se estimulan las plaquetas con trombina, ADP y colágeno, se libera el FvW de los gránulos, junto a otras proteínas (63, 137, 157) y hay un aumento del factor expresado en la superficie de la célula (69, 114).

Este es un proceso dependiente de iones divalentes y requiere la integridad del complejo de glicoproteínas IIb/IIIa (114). En la tromboastenia de Glanzmann, donde este complejo está disminuido o ausente, aunque se produce liberación normal del FvW plaquetario después de la estimulación con trombina, no hay aumento de su expresión en la membrana (114). En casos normales, debido a la acumulación de plaquetas en el sitio de la injuria vascular, el FvW plaquetario, puede alcanzar muy altas concentraciones y ejercer un importante papel en el proceso hemostático (116).

Interacción del Factor von Willebrand plasmático con las plaquetas.—

Una de las funciones biológicas conocidas del FvW es la de promover la hemostasis primaria mediante la interacción con las plaquetas y la pared del vaso (140). Esta función fue descubierta inicialmente por la presencia de tiempo de sangría prolongado, y disminución de la adhesividad de las plaquetas al subendotelio de aorta desnuda de conejo, en presencia de plasma deficiente de FVIII/FvW, problemas que se corregían cuando se utilizaban plasma o crioprecipitado normales (3). Se había supuesto que el FvW, solo era necesario para la adhesión inicial de las plaquetas al subendotelio, y que la agregación plaquetaria era independiente de este factor; sin embargo, recientemente se ha encontrado que la activación subsecuente, también depende del FvW (7, 8, 68, 118). Si el subendotelio de aortas desnudas es pretratado con anticuerpos anti FvW, se produce una alteración severa de la adhesividad, lo mismo si se usa plasma deficiente de este factor, indicando que ambos el FvW plasmático y el FvW endotelial son necesarios para la adhesividad plaquetaria (4, 130, 142, 143). No se sabe si el FvW plaquetario participa de este proceso, pero si está claro que el

FvW plasmático es necesario para una función plaquetaria normal. Esto se pone de manifiesto "in vitro", con el antibiótico *ristocetina*, el cual induce la aglutinación de las plaquetas cuando hay una suficiente concentración de FvW en el plasma (51, 152). La aglutinación ocurre en presencia de agentes quelantes (152) y con plaquetas fijadas (otros policones tienen el mismo efecto), mientras que para la agregación se necesitan iones divalentes y plaquetas activas. Cuando se añade *ristocetina* se produce aglutinación seguida de activación y agregación de las plaquetas. Esta función del FvW se llama **actividad del cofactor *ristocetina*** (153) y es debida en su mayor parte, a los multímeros de alto peso molecular. Por lo tanto, una respuesta defectuosa a *ristocetina*, indica que el nivel plasmático de FvW está bajo (menos del 30%) o que los grandes multímeros están ausentes (108, 127).

El receptor plaquetario para el FvW se considera que es la glicoproteína Ib (GPIb), como lo demuestra la falta de respuesta a *ristocetina* de plaquetas provenientes de pacientes con la enfermedad de Bernard-Soulier (59, 87); sin embargo, no se conoce el mecanismo exacto mediante el cual la *ristocetina* provoca la aglutinación plaquetaria, pero se piensa que la carga eléctrica positiva de la *ristocetina*, pudiera ser esencial para disminuir las cargas negativas de la superficie plaquetaria y así permitir la fijación del FvW, que también es electronegativo (15, 20, 45, 62). Recientemente se ha encontrado que el sitio de unión del FvW a la GPIb, es en la glicocalicina (14).

Los trabajos de Tanoue y col (237), midiendo la movilidad electroforética de plaquetas tratadas con quimotripsina (la cual reduce la GPIb) y de plaquetas normales, mostraron que cuando se añade FvW en presencia de *ristocetina*, disminuye la movilidad electroforética de las plaquetas normales en mayor proporción que si se añade FvW sólo, y en las plaquetas tratadas no se produce. Este resultado aunado al hecho conocido de que el FvW porcino que es menos electronegativo, interacciona con la plaqueta en reposo sin necesidad de *ristocetina*, y al conocimiento más reciente de que el asialo von Willebrand, que tiene su carga negativa bastante reducida, aglutina directamente las plaquetas (90), señala evidentemente que la repulsión electrostática que existe entre GPIb y el FvW es importante para que no se produzcan interacciones dañinas entre el FvW y las plaquetas (116). Hay controversia sobre si existe más de un sitio de fijación del FvW a la plaqueta. Los trabajos de Gralnick y Williams (42), sugieren que los multímeros más grandes tienen más afinidad para la fijación a las plaquetas, y que esta afinidad disminuye con la disminución de la talla multimérica; sin embargo, otros estudios muestran que la unión del monómero (obtenido por la reducción de la proteína) a la plaqueta, es igual a la unión de la proteína intacta (123, 135). También se ha sugerido que se necesita más de una plaqueta para formar sitios de unión con el FvW y que los estimulantes

como ristocetina actúan induciendo una microagregación inicial de plaquetas (123). Fauvel y col (30) han encontrado que la interacción de plaquetas con un extracto microfibrilar de aorta bovina, requiere la presencia de FvW y disponibilidad de la GPIb en la superficie de la plaqueta. Este extracto no tiene colágeno y es un potente inductor de la agregación plaquetaria, sin necesidad de ristocetina.

Recientemente se ha aislado del veneno de serpientes del género *Bothrops*, una sustancia que se ha denominado **botrocetina**, que es capaz de producir aglutinación plaquetaria dependiente de la presencia de FvW (101). De acuerdo a los resultados de Brinkhous, la botrocetina aglutina las plaquetas aún cuando el FvW carezca de los multímeros grandes (11). Sin embargo los resultados de Furlan y col (37) utilizando FvW reducido y plasma proveniente de pacientes con enfermedad de von Willebrand tipo II, donde están ausentes los grandes multímeros, se oponen a lo anterior, ya que encuentran una disminución marcada de la reactividad tanto a la ristocetina como a la botrocetina. Howard y col (52) por el contrario, consiguen que la botrocetina reacciona con un amplio espectro de grandes a pequeñas formas moleculares de FvW, y sugieren que los sitios de interacción con plaquetas en la molécula de FVIII/FvW son diferentes para ristocetina y botrocetina. Como apunta Furlan (37), es posible que estas discrepancias sean resultado de diferente metodología y por lo tanto son necesarias más investigaciones para dilucidar definitivamente, el mecanismo de interacción de esta nueva aglutinina, con el FvW y las plaquetas.

Fujimoto y col (33, 34) han demostrado que además de ristocetina y botrocetina, la trombina y otros inductores como el adenosin-difosfato (ADP), promueven la fijación del FvW a las plaquetas y se sugiere que son estas sustancias las que promueven la interacción fisiológica del FvW y las plaquetas, ya que están presentes en el sitio de la injuria vascular, al contrario de la ristocetina que es una sustancia extraña (9). Estos inductores fisiológicos en contraposición también a la ristocetina, requieren la presencia de iones divalentes y un metabolismo activo de la plaqueta, o sea que no funcionan con plaquetas fijadas, y además parecen ser mediados por el ADP endógeno (26, 33, 34, 115).

Los niveles intraplaquetarios de AMP cíclico regulan la disponibilidad de los receptores, que en el caso de los inductores fisiológicos estarían constituidos por el complejo de glicoproteínas IIb/IIIa (115), por esta razón los pacientes con tromboastenia de Glanzmann no fijan FvW a las plaquetas cuando éstas son estimuladas con trombina (113), ya que tienen un déficit congénito de este complejo de glicoproteína, mientras que las plaquetas de pacientes con enfermedad de Bernard-Soulier, se fijan FvW cuando se estimulan con trombina, pues esta fijación es independiente de

GPIb, pero la fijación está alterada si se estimulan con ristocetina (115, 137). El fibrinógeno que también se fija al complejo IIb/IIIa, compite con el FvW en la fijación a las plaquetas, bajo el estímulo de trombina y ADP, como también lo hace la fibronectina (99) lo que sugiere que las tres glicoproteínas comparten algunos de los sitios de fijación a las plaquetas.

Se ha tratado de encontrar los dominios o sitios funcionales en la molécula de FvW para la fijación a plaquetas, con resultados variables, aunque todos los trabajos coinciden en que los sitios funcionales del FvW se encuentran en pequeños fragmentos de la molécula. Martin y col (77) después de digestión enzimática de la proteína von Willebrand, encontraron que la actividad del cofactor ristocetina se correlacionaba con la concentración de un fragmento de peso molecular de 116.000. Uno de los anticuerpos monoclonales utilizados por Sixma y col (127) precipitaba un fragmento de FvW de PM 116.000, e inhibía la agregación plaquetaria inducida por ristocetina, así como también la fijación de FVIII/FvW a las plaquetas en presencia de ristocetina. Este fragmento consistía en dos subunidades de PM 52.000 y 56.000, las cuales poseían el epítotope para el mismo anticuerpo monoclonal. Recientemente Fujimura y col (35) después de digestión tróptica y cromatografía de alta presión del FVIII/FvW, aislaron un fragmento que retenía el cofactor ristocetina, el cual después de reducción y alquilación resultó consistir de un doblete de 52.000 y 48.000 Daltons, estos fragmentos al bloquearse con 3 anticuerpos monoclonales, inhibían la fijación mediada por ristocetina de FvW a plaquetas y neutralizaban el cofactor ristocetina de FvW intacto. Todos estos resultados sugieren que para la interacción del FvW y las plaquetas se requiere una estructura mínima secundaria o terciaria y que la secuencia lineal de aminoácidos que hay en esos fragmentos, define el sitio responsable de esta interacción (77).

Interacción del Factor von Willebrand con el subendotelio.—

Como ya fue mencionado, los experimentos realizados en aortas desnudas de conejos (3, 140), demostraron que el FvW se adhiere al subendotelio y que la adhesión de las plaquetas a las aortas de conejos o humanas desnudas de endotelio, era dependiente de la presencia de la proteína FVIII/FvW (7, 118). A pesar de que hay evidencias considerables de que el FvW media la adhesión de las plaquetas a fibrillas de colágeno subendoteliales, no está claro si hay otros componentes de la matriz endotelial que interaccionan con el FvW y cual es el mecanismo de esta interacción. Santoro (120) ha demostrado que los tipos de colágeno I, II y III pueden unirse al FvW y Scott y col (121) demostraron que no solamente se une al colágeno intersticial, sino también al de la membrana basal, o sea los colágenos tipo IV y V. Los requerimientos para la adhesión del FvW a colágeno, parecen depender más de que se mantenga la estructura cuaternaria, que del

tipo de colágeno, siempre que éste se encuentre bajo la forma fibrilar y que estén presentes los multímeros grandes de la molécula de FvW (91, 120).

Similarmente a los hallazgos en la interacción FvW/plaquetas el dominio funcional para la interacción FvW/colágeno, parece residir en una pequeña estructura de la molécula proteica, la cual según Sixma y col (128) pudiera ser un fragmento de 48.000, diferente al fragmento que interacciona con las plaquetas. Nosotros en colaboración con el Dr. C. Kessler (datos no publicados), al estudiar la interacción de FvW con colágeno fibrilar tipo I, observamos que el colágeno absorbía un fragmento de 116.000 Da y otro de 58.000 Da, disminuyendo la actividad del cofactor ristocetina en un 49%, estos resultados sugieren que el fragmento de 58.000 Da es una subunidad del de 116.000, el cual podría ser el puente de unión entre plaquetas y subendotelio.

Otros autores (148) han encontrado que el FvW se fija a la matriz depositada por diferentes células, aún cuando no esté presente el colágeno; este FvW pudiera ser parte del FvW que la célula endotelial deposita en la matriz y no estar relacionado con la interacción del FvW circulante y las estructuras subendoteliales (134). Como ya fue mencionado, Fauvel (30) aisló del subendotelio de aortas bovinas un extracto que interacciona con las plaquetas dependiendo de la presencia de FvW y que no es colágeno.

Síntesis del Factor von Willebrand.—

Existen evidencias de que el FvW se sintetiza en las células endoteliales de los vasos sanguíneos y en los megacariocitos. Se pudo observar que las células endoteliales en cultivos y en los megacariocitos, incorporaban aminoácidos marcados con isótopos radioactivos en el FvW (58, 93), demostrando que estas células lo sintetizan, mientras que no sintetizan FVIII. Aparentemente este FvW es procesado después de la síntesis y antes o durante su secreción al plasma, pierde un fragmento de 15.000 Da (69, 149). Recientemente Nagle y col (94) reportaron el hallazgo de FvW en el endotelio de los vasos linfáticos de perros, lo que podría significar que éste también fuera un sitio de síntesis de esta glicoproteína.

Anormalidades del FVIII/FvW en la enfermedad de von Willebrand.—

Aunque los conocimientos actuales señalan al FVIII y al FvW como dos proteínas separadas, existen ciertos hechos que las interrelacionan, como el que circulan en el plasma formando un solo complejo (156), la formación de un solo precipitado en la inmunoelectroforesis (6) y la fijación de anticuerpos mono y policlonales anti FvW, tanto a FVIII como a FvW del plasma, después que han sido entrecruzados con perlas de aga-

rosa (36, 141). Se cree que el FvW actúa como proteína transportadora y estabilizadora del FVIII (153), además de que puede tener una función facilitadora de la liberación o producción de este último, como lo evidencia el hecho de la elevación de los niveles de FVIII muy por encima de los niveles de FvW en enfermos que han recibido terapia sustitutiva (5).

Las anomalías del FVIII que aparecen en la enfermedad de von Willebrand, solo son cuantitativas y probablemente secundarias a la anomalía cuantitativa del FvW (43, 65, 104). En esta enfermedad el FVIII generalmente está menos disminuido que el FvW y aún en los casos más severos, se puede detectar entre 1 y 5% de actividad coagulante, lo cual sugiere que su deficiencia se deba a la falta de proteína transportadora (FvW) (106).

CLASIFICACION DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND

El mejor conocimiento del FVIII/FvW ha permitido detectar no solo anomalías cuantitativas sino también estructurales. En base a estas anomalías, se ha realizado la clasificación de la enfermedad.

Enfermedad de von Willebrand tipo I.—

Esta es probablemente la forma más común de EvW y está caracterizada por disminución proporcional de los niveles de FVIII y de FvW (156). Hasta hace poco no se conocía que hubiese anomalía estructural de la molécula del FvW, pero recientemente se han reportado casos con disminución relativa de los grandes multímeros, o sea que éstos aunque presentes, tienen una baja concentración en relación a los compuestos medianos y pequeños; estos casos se llamarán tipo IB y la forma arriba descrita sería tipo IA (98). Recientemente se ha descrito el tipo IC (83) donde en lugar de la tripleta en los multímeros individuales, solo se observa una banda, sin las bandas satélites de los multímeros normales. La concentración del FvW en las plaquetas es normal (106, 131), aunque algunos autores la han encontrado ligeramente disminuida (80), y la concentración en las células endoteliales y subendoteliales también es normal (47).

La transmisión genética de la enfermedad es autosómica dominante. La severidad puede ser moderada o ligera dependiendo de la concentración de FVIII/FvW y algunos individuos son fenotípicamente normales. El tiempo de sangría es a menudo prolongado pero puede ser normal, los niveles de FVIII y de FvW están disminuidos, lo mismo que el cofactor ristocetina y la agregación plaquetaria con este antibiótico. Dado que no hay defectos estructurales, el comportamiento del FvW en la inmunoelectro-

foresis cruzada es también normal.

Esta variedad de EvW puede ser tratada por períodos cortos con 1-deamino 8D-arginina-vasopresina (DDAVP). Este análogo de la vasopresina causa la liberación de FVIII y FvW de los depósitos tisulares al plasma, y corrige temporalmente la anomalía hemostática (111), lo que hace suponer que los pacientes con EvW tipo I, pueden sintetizar cantidades normales de FvW normal, pero no pueden por alguna razón liberarlo dentro de la circulación (116). Sin embargo en el recientemente descrito tipo IC, la inyección de DDAVP aunque corrige el tiempo de sangría, no modifica la alteración estructural (82). Mannucci y col (76) también demostraron la heterogeneidad de la EvW tipo I, en varias familias cuyas características en plasma correspondían a este tipo de enfermedad, pero que en las plaquetas se observaba una de las siguientes situaciones: FvW y cofactor ristocetina normales con normalización de plasma y tiempo de sangría después de DDAVP, pacientes con FvW y cofactor ristocetina disminuidos que no normalizaban ni el plasma ni el tiempo de sangría con esta vasopresina y pacientes con FvW normal pero con alteraciones estructurales y cofactor ristocetina muy bajo, quienes después de DDAVP normalizaban el FvW plasmático, pero no el cofactor ristocetina, ni el tiempo de sangría.

La forma más severa de esta enfermedad, es de tipo homocigoto, se hereda a través de un gen autosómico recesivo (57, 106, 124, 156) y algunos autores lo han llamado vW tipo III, porque al analizar el escaso factor presente han encontrado en algunos casos anomalías estructurales (106). Los niveles de FVIII/FvW en plasma y endotelio son prácticamente indetectables, probablemente por síntesis defectuosa. El cofactor ristocetina está ausente y por lo tanto la función plaquetaria es anormal (47, 156).

Enfermedad de von Willebrand tipo II.—

El FvW de este grupo de enfermos presenta diversos trastornos estructurales. Se caracteriza por la ausencia de los grandes multímeros en la circulación, pero con diferentes patrones en plasma y plaquetas.

En el tipo IIA de la EvW hay ausencia de grandes multímeros en plasma y plaquetas y alteración del patrón de tripleta, ya que la banda que migra más rápidamente está aumentada (107, 131). Se cree que este defecto estructural sea una incapacidad congénita para sintetizar los grandes multímeros. El cofactor ristocetina está disminuido, aún cuando el FvW sea cuantitativamente normal en el plasma, y los niveles de FVIII pueden estar normales o disminuidos, generalmente más altos que los de FvW. El tiempo de sangría se encuentra prolongado. Estas alteraciones son explicables por la ausencia de los grandes multímeros, que como ya se señaló son los

que aparentemente tienen más actividad hemostática.

La inyección de DDAVP, causa la liberación en el plasma de FvW con las mismas anomalías basales, demostrando que las células endoteliales o no sintetizan los grandes multímeros, o son incapaces de almacenarlos (131, 156).

En el tipo IIB, los grandes multímeros están ausentes en plasma, pero presentes en plaquetas, por lo cual la agregación plaquetaria con ristocetina, está aumentada y la respuesta plaquetaria se registra a dosis del anti-biótico inferiores a las utilizadas con plasmas normales (109), ya que al activarse las plaquetas, los grandes multímeros se liberan al medio de incubación. Por el contrario, el cofactor ristocetina se encuentra disminuido pues el plasma carece de suficientes multímeros grandes para aglutinar plaquetas lavadas, cuando se añade ristocetina, mientras que cuantitativamente el FvW y el FVIII pueden estar normales o disminuidos (109).

La inyección de DDAVP causa la liberación de los grandes multímeros a la circulación, pero desaparecen rápidamente de ella. Esto sustenta la hipótesis según la cual, el endotelio y las plaquetas producen y almacenan los grandes multímeros en forma normal, pero que al llegar a la circulación desaparecen rápidamente debido a interacción aumentada con las plaquetas u otros sitios de unión (48). De nuevo esto es apoyado por el hecho de que el plasma extraído después de la inyección de DDAVP a pacientes con EvW tipo IIB, causa la agregación de plaquetas normales mientras que el paciente registra trombocitopenia después de la inyección de esta vasopresina (49).

El hecho de que los pacientes que tienen esta variedad de EvW sangren, a pesar de que sus plaquetas contienen grandes multímeros, hace suponer, que el FvW circulante debe interaccionar con el subendotelio antes de unirse a las plaquetas (116).

Recientemente se demostró in vitro (25) que la fijación del FvW tipo IIB a la glicoproteína Ib, induce la exposición de receptores para el fibrinógeno plaquetario, e inicia la agregación cuando se añade a concentrados tan bajos de éste como 10 ug/ml. Esta reacción se bloquea con anticuerpos monoclonales anti GPIb y anti GPIIb/IIIa, inhibiéndose así la agregación inducida por fibrinógeno y calcio. Lo anterior demuestra que la agregación plaquetaria inducida por el FvW tipo IIB es desencadenada por la fijación inicial de esta proteína anormal a GPIb, seguida por la exposición de receptores en GP IIb/IIIa, a los que se une el fibrinógeno y actúa como cofactor necesario para una respuesta agregatoria completa.

Se ha descrito otra variante del tipo IIB de la EvW y es la variedad IIB Tampa (117), la cual se caracteriza por las mismas alteraciones que en el tipo IIB, pero además cursa con trombocitopenia crónica, agregados plaquetarios circulantes y agregación espontánea in vitro, con diátesis hemorrágica moderada.

En la enfermedad de von Willebrand tipo IIC la anomalía estructural se parece al vW IIA, los grandes multímeros están ausentes en la circulación y en las plaquetas, los niveles de FvW y FVIII pueden estar normales o disminuídos, y la agregación del plasma rico en plaquetas estimulado por ristocetina, así como el cofactor ristocetina están marcadamente disminuídos (104, 105, 106). La diferencia de esta variante con el tipo IIA reside en que en la electroforesis en agarosa y gel de poliacrilamida, en lugar de aparecer tripletas, aparecen dobletes que se repiten, y hay un aumento de los multímeros que se mueven más rápido, o sea los más pequeños. Genéticamente esta variante se transmite en forma recesiva, presentándose las manifestaciones clínicas en el individuo homocigoto (2, 112).

Otra nueva variante, llamada tipo IID ha sido descrita por Kinoshita y col (61). En este tipo las concentraciones de FvW y FVIII son normales en plasma, pero los multímeros grandes están ausentes en plasma y plaquetas. En la electroforesis en agarosa al 3% se observan 4 bandas en lugar de 3. Recientemente Manucci y col (75) han descrito otra variante del tipo II con multímeros grandes ausentes en plasma y presentes en plaquetas, pero donde la unidad repetida (protómero) presentaba en el plasma una estructura aberrante, con 5 bandas, mientras que era normal en las plaquetas; después de la inyección de DDAVP, los grandes multímeros aparecían en el plasma, normalizándose los niveles de FvW y del cofactor ristocetina, pero sin embargo, el tiempo de sangría se mantenía alargado.

Enfermedad de von Willebrand de tipo plaquetario.—

Esta variedad también llamada pseudo enfermedad de von Willebrand, se caracteriza por aumento de la interacción de las plaquetas con el FvW de la circulación, como resultado de una anomalía plaquetaria. Las plaquetas tienen gran afinidad para adsorber grandes multímeros del FvW plasmático, lo que resulta en una anomalía semejante a la EvW tipo IIB, o sea grandes multímeros ausentes en plasma y presentes en plaquetas (84, 85, 155). El FvW humano ya sea en plasma, crioprecipitado o purificado, induce la aglutinación de las plaquetas, aún sin estímulo de otro tipo; otro tanto sucede con el FvW bovino, y la aglutinación con ristocetina o botrocetina, ocurre a concentraciones menores de estos agentes, que las utilizadas normalmente (84, 85, 136).

Cuando se utiliza asialo FvW, se aglutinan las plaquetas normales y las

plaquetas con pseudo EvW, pero si se añade EDTA al medio, se inhibe la aglutinación de plaquetas normales y persiste en las plaquetas de pseudo EvW, o sea que la aglutinación se produce por un mecanismo diferente (86).

Enfermedad de von Willebrand adquirida.—

Se han reportado varios casos con aparición súbita de manifestaciones hemorrágicas, acompañadas de tiempo de sangría prolongado, en personas que previamente eran normales desde el punto de vista de la hemostasis. En estos casos el complejo FVIII/FvW se encuentra cuantitativamente disminuído y por presentarse con frecuencia asociado a enfermedades donde está comprometido el sistema inmune, se piensa que la diátesis hemorrágica es causada por la presencia de anticuerpos anti-FvW (46). Este síndrome se ha reportado en asociación con lupus eritematoso diseminado (125), gammapatías monoclonales (74, 126) desórdenes linf y mieloproliferativos (74, 144, 151), tumor de Wilms (122) y lesiones angiodisplásicas (78, 105). En varios casos se han detectado anticuerpos que neutralizan la actividad coagulante del FVIII e interfieren con el FvW inhibiendo el cofactor ristocetina; y Lazarchick y col (66) han descrito un caso donde el inhibidor estaba dirigido exclusivamente al cofactor ristocetina. La mayoría de estos anticuerpos son IgG o IgM (27, 32, 55) pero se han descrito casos donde el anticuerpo era IgA (44).

También se ha descrito desaparición de los grandes multímeros del FvW (139, 144). En un caso reciente de síndrome mieloproliferativo (144), las anomalías estructurales se corrigieron parcialmente con la administración de la quimioterapia específica y la hemostasis se corrigió al tratar al paciente con DDAVP o con la fracción I de Cohn. Además se han descrito alteraciones estructurales del FvW en el síndrome urémico-hemolítico, durante episodios asociados con altos niveles de FVIII/FvW y trombocitopenia (89); sin embargo no se ha hallado ninguna evidencia de activación intravascular de las plaquetas y la disminución de los grandes multímeros en el plasma, se piensa que sea por un depósito selectivo de éstos en las superficies subendoteliales expuestas por la injuria vascular en el riñón, con aumento de la fijación de las plaquetas a estas superficies, lo cual explicaría la trombocitopenia. En contraste con lo anterior, se ha descrito la presencia de multímeros más grandes de lo normal en el plasma de pacientes con púrpura trombocitopénica trombótica, lo cual se cree sea debido a un defecto en la conversión de los grandes multímeros de las células endoteliales, a multímeros un poco menores como son los multímeros circulantes (33, 88, 149).

Asociación de la EvW a otras enfermedades.—

La EvW se ha encontrado con frecuencia asociada a trastornos here-

ditarios del tejido conjuntivo, tales como telangiectasia hemorrágica hereditaria (16, 29, 100), prolapso de válvula mitral (97) y anemia drepanocítica (12). También se puede hallar asociación de esta enfermedad con defectos plaquetarios cualitativos y cuantitativos (17, 19, 28) fibrinogenopatías (96) y deficiencias de FXII (18).

Bases genéticas de la Enfermedad de von Willebrand.—

La existencia de varios subtipos de esta enfermedad, sugiere que haya varios mecanismos para producir el fenotipo. La forma más común o tipo I se hereda en forma autosómica dominante, con expresión variable entre los miembros de una misma familia (56). Los subtipos II, también se heredan en forma autosómica dominante, con excepción del tipo IIC donde la herencia es autosómica recesiva, al igual que en el tipo III. Estas formas recesivas sugieren la existencia de un gen "nulo" y de por lo menos un gen mutante que codifica el factor de estructura anormal (2), o sea que el padre con el FvW normal poseería un gen nulo y el hijo heredaría este gen nulo y el gen anormal del otro progenitor, como en la familia con EvW tipo IIC descrita por Armitage (2). Los pacientes con EvW tipo III son generalmente homocigotos o doble heterocigotos (123, 130, 144) y producto de matrimonios consanguíneos.

Aspectos clínicos.—

La incidencia de la EvW es difícil de establecer. Por un lado, la enfermedad puede pasar desapercibida en casos muy moderados y por otro, los métodos diagnóstico que permiten una mejor identificación de la enfermedad, no están disponibles para muchos laboratorios, por lo que se pueden incluir falsos casos, y viceversa, excluir pacientes que padecen la enfermedad, pero cuyas manifestaciones clínicas difieren en algo de la descripción clásica.

La severidad y frecuencia de las manifestaciones clínicas varían de acuerdo a la severidad de la alteración en el complejo FVIII/FvW. En el vW tipo I cuanto más bajas las concentraciones de los factores de este complejo, mayor será el problema de coagulación y más largo el tiempo de sangría del paciente. Cuando el defecto del FvW no es cuantitativo sino estructural, como es el caso de los subtipos II, las manifestaciones clínicas ya no dependen tanto de la concentración del factor, como de la deficiencia de los multímeros grandes y medianos y puede haber niveles plasmáticos normales de FvW, con manifestaciones clínicas severas.

En la forma severa de la enfermedad, las manifestaciones clínicas comienzan temprano, y se atenuan en la vida adulta. En estos casos la causa

más frecuente de consulta son las epistaxis, aunque puede haber sangramiento en cualquier área cutáneo-mucosa, siendo frecuentes los sangramientos gastrointestinales y génito-urinaros y en las mujeres las menorragias y el sangramiento del post-partum. Con frecuencia se detecta la enfermedad después de una intervención quirúrgica, cuando la hemorragia ha sido profusa y prolongada, especialmente después de tonsilectomía o extracción dental. A no ser que se trate de formas muy severas, como en el caso de los homocigotos o doble heterocigotos, no es frecuente que se presenten hemartrosis o sangramientos musculares.

Curso y Pronóstico.—

Esta enfermedad tiende a moderarse con el paso de los años, aunque en la mujer, la etapa fértil de la vida puede estar complicada por la presencia de menorragias que pueden ser muy abundantes y requerir terapia sustitutiva. Durante el embarazo, el complejo FVIII/FvW aumenta, por lo que las manifestaciones clínicas de la EvW tipo I mejoran ostensiblemente; sin embargo en los subtipos II generalmente no se registra mejoría ya que el FvW aunque aumentado, mantiene las alteraciones estructurales. Actualmente se dispone de una serie de productos que en la forma moderada de la enfermedad ofrecen alternativas a la terapia sustitutiva, por ende disminuyendo los riesgos asociados a la administración de hemoderivados y mejorando las expectativas de vida.

Diagnóstico.—

Los criterios para el diagnóstico de la EvW, incluyen además de los aspectos clínicos mencionados, tiempo de sangría alargado y alteraciones cuantitativas o cualitativas del FvW, o sea que el diagnóstico definitivo requiere del auxilio del laboratorio.

El tiempo de sangría generalmente está alargado, aunque en ocasiones, especialmente en el tipo I puede ser normal en alguna época, por lo que es conveniente realizar esta prueba con cierta frecuencia en un mismo paciente. El método más aceptado es el de Ivy modificado con la plancheta de Mielke (82), el cual permite resultados más fidedignos, ya que se realiza a una presión constante, realizando una incisión de longitud y profundidad también constantes.

La determinación cuantitativa del FvW se puede realizar mediante inmunolectroforesis, utilizando la técnica de Laurell (65), por inmunolectroforesis radiocuantitativa (72) o por ensayos enzimáticos o radiométricos (IRMA). En la forma clásica tipo I los niveles del factor están disminuidos, generalmente por debajo de los niveles de FVIII y en las variantes tipo II los niveles pueden estar normales o disminuidos (116).

El examen cualitativo del FvW se puede hacer mediante inmunodifusión (72), inmunolectroforesis bidimensional (53) y ensayo inmunorradiométrico (IRMA). Estos métodos permiten distinguir anomalías estructurales, por ejemplo las variedades tipo II de FvW son menos anódicas. La electroforesis de plasma en glioxi-agarosa y dodecilsulfato de sodio (SDS), seguida de reacción con anticuerpo anti vW marcado con 125 I y posterior autoradiografía (54, 108, 110), permite distinguir la distribución multimérica del FvW y por lo tanto hacer un diagnóstico más seguro de los diferentes subtipos que existen.

La actividad del cofactor ristocetina, puede ser determinada utilizando plaquetas normales frescas lavadas o fijadas en formalina, a las que se añaden el plasma control o del paciente, y ristocetina, y se observa la aglutinación de las plaquetas, ya sea en el agregómetro (50), el microscopio (103) o directamente (1). Esta actividad suele estar disminuída en todas las variantes de la enfermedad de von Willebrand, especialmente en los subtipos II y III.

El estudio de la agregación plaquetaria después de añadir ristocetina al plasma rico en plaquetas del paciente, es otra técnica que ayuda al diagnóstico, ya que generalmente se encuentra disminuída en todos los tipos de von Willebrand, con excepción de los tipos IIB y plaquetario, donde la respuesta está aumentada aún utilizando cantidades menores de ristocetina.

Otra prueba diagnóstica que se utiliza en la enfermedad de von Willebrand, es la medición de la adhesividad plaquetaria a perlas de vidrio (119), la cual generalmente está disminuída en esta enfermedad; sin embargo, este es un método que aparte de que ofrece un amplio rango de normalidad, es muy oneroso por lo que cada vez se usa menos.

El factor VIII puede estar normal o disminuído dependiendo de la severidad de la enfermedad, su medición se puede realizar en una (58) o dos etapas (22).

Por último la medición del tiempo de tromboplastina parcial puede ayudar en la orientación del cuadro clínico, ya que se encuentra alargado cuando la concentración del FVIII es menor del 25%.

Tratamiento.—

El propósito del tratamiento es corregir el tiempo de sangría prolongado y las anomalías del complejo FVIII/FvW. Para conseguir esto, se debe utilizar una forma de terapia que provea al paciente de multímeros

de alto peso molecular (que como se ha señalado, de ellos depende el acortamiento del tiempo de sangría) y que al mismo tiempo lleve la concentración de FVIII a niveles aceptables para una buena hemostasis. Estos requerimientos no se pueden cumplir con el simple uso de plasma fresco, ya que las necesidades de FvW conllevarían la administración de un excesivo volumen líquido al paciente. Tampoco se pueden cumplir las necesidades, con la administración de concentrados de FVIII, pues aunque con ellos se pueden infundir al paciente grandes cantidades de este factor en un pequeño volumen, no se logra la hemostasis, debido a que el método de purificación del FVIII causa la degradación del FvW (81). Solo el crioprecipitado provee en un pequeño volumen buenas cantidades de FvW que conserva su estructura intacta, además de contener FVIII; la cantidad de crioprecipitado a administrar dependerá de la severidad de la hemorragia. La dosis se calcula tomando como referencia la actividad del FVIII y se recomienda el volumen de crioprecipitado que contenga la concentración de este factor, equivalente a 10 a 40 U/kg de peso. En caso de hemorragias severas, esta cantidad se suele administrar cada 12 horas, debido al rápido catabolismo de los polímeros, que hace que la efectividad sea solo transitoria; en la práctica es recomendable guiarse por el tiempo de sangría y administrar una nueva dosis cuando el tiempo de sangramiento se vuelva a prolongar. En casos de cirugía se administra la cantidad suficiente para elevar los niveles de FVIII entre 70 y 100% antes de la intervención, si hay sangramiento significativo se administra otra dosis durante el proceso quirúrgico o al final de éste y después cada 8 a 12 horas por 5 a 7 días cuando se produzca la cicatrización de la herida.

Una fórmula simple para calcular la cantidad de crioprecipitado a administrar es la siguiente:

$$\frac{\% \text{ Actividad deseada} - \% \text{ Actividad presente}}{2} = \text{UI/kg peso.}$$

Si 1 UI de FVIII/kg de peso corporal eleva a 2% la actividad en el plasma, para alcanzar una actividad de 50% en un paciente que tiene 2% de actividad de FVIII, se necesita una elevación de 48% o sea 24 UI/kg de peso (39). Si se trata de un paciente de 60 kg, se necesitará un total de 1440 UI de FVIII. Suponiendo que cada bolsa de crioprecipitado contenga 250 UI, el paciente necesitaría aproximadamente 6 bolsas de crioprecipitado cada 12 horas. Es necesario señalar la importancia del control de calidad en la preparación del crioprecipitado, de manera que la estimación del volumen y concentración de FVIII en cada bolsa de crioprecipitado sea lo más cercana posible a la realidad.

Esta forma de terapia, aunque con menor frecuencia que los concentrados de FVIII, lleva consigo el riesgo de la adquisición de enfermedades

transmisibles a través de hemoderivados, tales como hepatitis B y hepatitis no A no B, o el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, por lo que se buscan alternativas para este tratamiento. En efecto, existen varios productos que en condiciones específicas pueden ser utilizados para disminuir las necesidades transfusionales, como es el caso del uso de antifibrinolíticos en procedimientos odontológicos, donde previa corrección del FVIII hasta el 50% con crioprecipitado, se administra ácido epsilon-amino caproico (AEAC) en dosis de 100 mg/kg de peso cada 6 horas (no más de 24 g por día) o ácido tranexámico (AMCA) a dosis diarias de 4 a 6 g, repartidos en varias tomas. En general estos productos son bien tolerados, pero están absolutamente contraindicados en presencia de hematuria o cuando se sospeche lesión renal.

En aquellos pacientes cuya principal manifestación clínica está representada por menorragias e hipermenorreas, se obtienen buenos resultados con la administración de anticonceptivos orales, aprovechando el efecto farmacológico de los estrógenos de elevar el complejo FVIII/FvW.

En 1975 Mannuci y col (73), demostraron que un análogo sintético de la vasopresina, la 1 amino-8D arginina-8D vasopresina (DDAVP), administrado por vía endovenosa, producía un aumento del complejo FVIII/FvW y sus propiedades. Esto se pudo observar en pacientes con hemofilia A y pacientes con enfermedad de von Willebrand que tenían niveles detectables de estos factores, pero no en los casos severos donde no se podían detectar. Este efecto también se producía en personas normales.

La dosis usual es de 0.3 ug/kg de peso en una sola inyección lenta (15 a 30 minutos) (21), diluída en 30 ml de solución salina fisiológica; en niños menores de 10 kg se diluye en 10 ml. Utilizada a intervalos de 12 a 24 horas produce taquifilaxis, o sea que para que vuelva a tener efecto, deben transcurrir entre 3 y 4 días (150). Se recomienda en pacientes con enfermedad de vW tipo I que tienen niveles de factor VIII mayores del 5% y que deben ser intervenidos quirúrgicamente, o en otros episodios traumáticos, sangramiento mucoso, hematomas intramusculares etc. En casos de intervención quirúrgica se administra 30 minutos antes de la operación (150), haciendo la salvedad de que aquellos pacientes que tienen FvW o cofactor ristocetina anormales en las plaquetas, no normalizan el tiempo de sangría después de DDAVP.

La forma homocigota de la EvW (vW tipo III) y el vW tipo IIA no responden a la inyección de DDAVP. En el caso de vW tipo IIA, aumentan los niveles de FvW en el plasma, pero es el mismo FvW anormal, donde no hay multímeros grandes. En la EvW tipo IIB y en el tipo plaquetario, hay contraindicación para el uso de este derivado de la vasopresina, ya que su inyección causa que se activen las plaquetas con liberación del FvW plaque-

tario y agregación plaquetaria intravascular y el consiguiente riesgo de trombosis para estos pacientes(49). No es conveniente administrar el DDAVP a personas hipertensas, y por su efecto antidiurético se recomienda no ingerir más agua de la necesaria para evitar intoxicación acuosa e hiponatremia. Se puede administrar con AEAC sin efectos adversos.

Las reacciones adversas con la utilización de DDAVP incluyen cefaleas, mareos, dolores abdominales, a veces eritema local, inflamación, dolor y rubor en la facies (21), sin embargo estas reacciones son muy moderadas y no contraindican el uso de este agente.

Como apuntan Ruggeri y Zimmerman (116) con el desarrollo de nuevas técnicas, como el uso de anticuerpos monoclonales y especialmente lo que se refiere a tecnología de DNA recombinante, se puede llegar a una mejor caracterización de los dominios funcionales de la molécula de FvW y a la vez, a la construcción de péptidos sintéticos capaces de modular el proceso de la adhesión plaquetaria a las estructuras subendoteliales del vaso cuya continuidad endotelial ha sido dañada.

ABSTRACT

Von Willebrand disease. Review. Ewald M., Vizcaíno G. (*Instituto de Investigaciones Clínicas. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Apartado Postal 1151. Maracaibo. Venezuela*). *Invest Clín* 27(2): 111-148, 1986.— Von Willebrand disease is a hereditary hemorrhagic disorder characterized by mucocutaneous bleeding, prolonged bleeding time, and quantitative or qualitative abnormalities of von Willebrand Factor (vWF). The von Willebrand Factor is found in plasma as part of a complex, with FVIII. Ninety five percent of the complex mass corresponds to vWF, which has a molecular weight from 440×10^3 D to 20×10^6 D. The structure of vWF is composed of a series of multimers. The smallest circulating multimer is a protomer, with a molecular weight of 440×10^3 D. The successive multimers increase their molecular weights in 400×10^3 , thus the next multimer to the protomer has a molecular weight of 880×10^3 D. By means of electrophoresis in SDS-agarose gel, it is possible to observe that each multimer consists of a central band and two satellite bands (triplet). The vWF serves as a bridge between platelets and subendothelial structures, collagen among them, thus favoring platelet adhesion to the injured vessel wall. The binding of vWF to platelets takes place through platelet membrane receptors, probably on glycoprotein Ib. This interaction can be observed in vitro, by the use of the antibiotic ristocetin, which induces platelet agglutination when sufficient concentration of vWF is present. The functional domains, on the vWF molecule, for the interaction with platelets seem to reside on a very small tertiary or quaternary structure with

a molecular weight between 52.000 and 58.000 D. There is considerable evidence showing that vWF mediates the adhesion of platelets to subendothelial collagen fibrils. Collagen types I, II, III, IV and V are all capable of absorbing vWF, as long as their quaternary structure and fibrillar form are maintained, and on the part of vWF, the presence of high molecular weight multimers is necessary for optimal absorption to collagen. The specific functional domain for this interaction also seems to reside on a small structure of the vWF molecule, probably a polypeptide fragment of 58000 D. The classification of vWD is based on the quantitative and structural abnormalities of the vWF: In **vWD type I** there are decrease levels of vWF in plasma and platelets, with proportional reduction of multimers of all sizes. **Type II vWD**, is subdivided in type IIA, where the larger multimers are absent from plasma and platelets, and type IIB where the large multimers are absent from plasma, but present in platelets. Subtype IIB has a variant (IIB Tampa), characterized by chronic thrombocytopenia and spontaneous platelet aggregation. **Von Willebrand disease type III** is the more severe form of vWD, with minute amounts of vWF. It is thought to be the homozygote form of vWD type I. There are other types of vWD, such as IA, IB, IC, IIC and IID, that are variants of those already described. **Pseudo vWD or platelet type vWD** is characterized by abnormal platelet receptors and normal vWF. Due to the abnormality on the platelet membrane the interaction with vWF is enhanced and the larger vWF multimers are removed from plasma. Acquired vWD has been described in association with several diseases (e.g. myelo and lymphoproliferative syndromes, monoclonal gammopathies). In most cases antibodies that neutralize FVIII and ristocetin cofactor activities have been identified. These antibodies are usually IgG or IgM and occasionally IgA. In certain malignancies the absence of the large multimers of vWF has been observed. Congenital von Willebrand disease can also be found accompanying other hereditary disorders such as mitral valve prolapse, hereditary hemorrhagic telangiectasia and sickle cell disease. The severity of the clinical manifestations in vWD depends on the degree of alteration in the FVIII/vWF complex. If the defect is quantitative as in vWD type I, the clinical manifestations will be determined by the coagulation abnormality, due to deficient FVIII and the prolonged bleeding time, caused by deficient vWF. When the molecular structure of vWF is altered, there may be severe clinical manifestations with normal FVIII and vWF levels. The diagnosis of vWD is based on clinical criteria and laboratory findings. Quantitative and qualitative studies of vWF can be performed by means of immunoelectrophoretic, immunoenzymatic or immunoradiometric assays and SDS agarose or polyacrylamide gel electrophoresis. Von Willebrand disease has a tendency to diminish in severity with age. Young children and women are mainly affected by epistaxis and uterine hemorrhages respectively. Factor VIII/vWF increases during pregnancy, and during treatment with

estrogens, with improvement of the clinical manifestations of the disease. Cryoprecipitate is the most effective therapy for this disease. In type I vWD the use of DDAVP, prior to surgical procedures, provides good hemostasis in patients with more than 5% of FVIII. The injection of DDAVP has no effect of type IIA vWD and is contraindicated in type IIB and platelet type vWD.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1— ALLAIN J.P., COOPER H.A., WAGNER R.H.: Platelets fixed with paraformaldehyde: a new reagent for assay of von Willebrand factor and platelet aggregating factor. *J Lab Clin Med* 85: 318-328, 1975.
- 2— ARMITAGE H., RIZZA C.R.: Two populations of factor VIII-related antigen in a family with von Willebrand's disease. *Br J Haematol* 41: 279-289, 1979.
- 3— BAUMGARTNER H.R., TSCHOPP T.B., WEISS H.J.: Platelet interaction with collagen fibrils in flowing blood II. Impaired adhesion-aggregation in bleeding disorders. *Thromb Haemost* 37: 17-28, 1977.
- 4— BAUMGARTNER H.R., TSCHOPP T.B., MEYER D.: Shear rate dependent inhibition of platelet adhesion and aggregation on collagenous surfaces by antibodies to human factor VIII/von Willebrand factor. *Br J Haematol* 44: 127-139, 1980.
- 5— BENNETT B., RATNOFF O.D., LEVIN J.: Immunologic studies in von Willebrand's disease. Evidence that the antihemophilic factor (AHF) produced after transfusions lacks an antigen associated with normal AHF and the inactive material produced by patients with classic hemophilia. *J Clin Invest* 51: 2597-2601, 1972.
- 6— BIRD P., RIZZA C.R.: A method for detecting factor VIII clotting activity associated with factor VIII related antigen in agarose gels. *Br J Haematol* 31: 5-12, 1975.
- 7— BOLHUIS P.A., SAKARIASSEN K.S., SIXMA J.J.: Adhesion of blood platelets to human arterial subendothelium: Role of Factor VIII-von Willebrand factor. *Haemostasis* 8: 312-321, 1979.
- 8— BOLHUIS P.A., SAKARIASSEN K.S., SAUDER H.J.: Binding factor VIII-von Willebrand factor to human arterial subendothelium precedes increased platelet adhesion and enhances platelet spreading. *J Lab Clin Med* 97: 568-576, 1981.
- 9— BORN G.V.R.: Research on the mechanisms of the intravascular

- adhesion of circulating cells. In *Platelets and Thrombosis*. Sherry S, Scriafine A (eds): ppg 113-126, Baltimore, University Park Press, 1974.
- 10— BOUMA B.N., HORDIJK-HOS J.M., DE GRAAF S.: Presence of factor VIII-related antigen in blood platelets of patients with von Willebrand's disease. *Nature* 257: 510-512, 1975.
 - 11— BRINKHOUS K.M., READ M.S., FRICKE W.A., WAGNER R.H.: Botrocetin (venom coagglutinin): Reaction with broad spectrum of multimeric forms of factor VIII macromolecular complex. *Proc Natl Acad. Sci USA*. 80: 1463-1466, 1983.
 - 12— BRODY J.I., LEVISON S.P., JUNG C.J.: Sickle cell trait and hematuria associated with von Willebrand syndromes. *Ann Intern Med* 86: 529-533, 1977.
 - 13— CATALANO P.M., SHAPIRO S.S., DE MARCO L., LONDON F.: Binding properties of tritiated human asialo-factor VIII (ASVIII) to human platelets. *Blood* 58: Suppl 1: 190a, 1981.
 - 14— CIARAVELLA G., CIARAVELLA N., ANTONCECCHI S., DE MATTIA D., RANIERI P., DENT J., ZIMMERMAN T., RUGGERI Z.M.: High resolution analysis of von Willebrand factor multimeric composition defines a new variant of type I von Willebrand disease with aberrant structure but presence of all size multimers (Type IC). *Blood* 66: 1423-1429, 1985.
 - 15— COLLER B.S., GRALNICK H.R.: Studies on the mechanisms of ristocetin-induced platelet agglutination. Effects of structural modification of ristocetin and vancomycin. *J Clin Invest* 60: 302-312, 1977.
 - 16— CONLON C.L., WEINGER R.S., CIMO P.L., MOAKE J.L., OLSON J.D.: Telangiectasia and von Willebrand's disease in two families. *Ann Intern Med*. 89: 921-924, 1978.
 - 17— CORDER M.P., CULP N.W., BARRETT O Jr.: Familial occurrence of von Willebrand's disease. Thrombocytopenia and severe gastrointestinal bleeding. *Am J Med Sci*. 265: 219-223, 1973.
 - 18— CRAMER A.D., MELARAGNO A.J., PHIFFER S.J., HOUGIE C.: Von Willebrand disease San Diego, a new variant. *Lancet* II: 12, 1976.
 - 19— CHESNEY C., COLMAN R.W., PECHET L.: A syndrome of platelet-release abnormality and mild hemophilia. *Blood* 43: 821-830, 1974.

- 20— DACOBER J.G., ROBERTS J.C.: An electrical double layer theory for platelet adhesiveness and initiation of intravascular thrombosis. *Thromb Diath Haemorrh.* 19: 451-458, 1968.
- 21— DE LA FUENTE B., KASPER C.K., RICKLES F.R., HOYER L.W.: Response of patients with mild and moderate hemophilia A and von Willebrand's disease to treatment with desmopressin. *Ann Int Med* 103: 6-14, 1985.
- 22— DENSON K.W.E.: The simplified two stage assay for factor VIII. In: *Human blood coagulation, haemostasis and thrombosis.* p. 688. Biggs R (ed) Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1976.
- 23— DE MARCO L., SHAPIRO S.S.: Properties of human asialo Factor VIII. A ristocetin-independent platelet aggregating agent. *J Clin Invest* 168: 321-328, 1981.
- 24— DE MARCO L., GIROLAMI A., RUSSELL S., RUGGERI Z.: Interaction of asialo von Willebrand factor with glycoprotein Ib induces fibrinogen binding to the glycoprotein IIb/IIIa complex and mediates platelet aggregation. *J Clin Invest* 75: 1198-1202, 1985.
- 25— DE MARCO L., ZIMMERMAN T.S., RUGGERI Z.M.: Interaction to IIB von Willebrand factor with glycoprotein Ib induces exposure of the platelet fibrinogen receptor and initiates aggregation. *Clin Res* 33: 308A, 1985.
- 26— DI MINNO G., SHAPIRO S.S., CATALANO P.M.: The role of ADP secretion and thromboxane synthesis in factor VIII binding to platelets. *Blood* 62: 186-190, 1983.
- 27— DIEZ-EWALD M., LIAN C.E., NUÑEZ R., DEYKIN D., HARKNESS D.R.: Circulating anticoagulant in a family with prolonged bleeding time and Factor VIII deficiency. *Blood* 49: 799-806, 1977.
- 28— DOWLING S.V., MUNTZ R.H., D'SOUZA S., EKERT H.: Platelet release abnormality associated with a variant of von Willebrand's disease. *Blood* 47: 265-274, 1976.
- 29— ESHAM R.H., SKILLING F.C. Jr, DODSON W.H., HAMMACH W.J.: Hereditary hemorrhagic telangiectasia and factor VIII deficiency. *Arch Intern Med.* 134: 327-329, 1974.
- 30— FAUVEL F., GRANT M.E., LEGRAND Y.J.: Interaction of blood platelets with a microfibrillar extract from adult bovine aorta: Requirement for von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci. USA* 80: 551-554, 1983.

- 31— FEDERICI A.B., ELDER J.H., DE MARCO L.: Carbohydrate moiety of von Willebrand factor is not necessary for maintaining multimeric structure and ristocetin cofactor activity but protects from proteolytic degradation. *J Clin Invest* 74: 2049-2055, 1984.
- 32— FEINSTEIN D.I.: Acquired inhibitors against FVIII and other clotting proteins. In: *Haemostasis and Thrombosis: Basic principles of clinical practice.* pag. 563-576, RW Colman, J Hirsh, VJ Marder, EW Salzman (eds) Philadelphia Lippincott, 1981.
- 33— FUJIMOTO T., HAWIGER J.: Adenosine diphosphate induces binding of von Willebrand factor to human platelets. *Nature* 297: 154-157, 1982.
- 34— FUJIMOTO T., O'HARA S., HAWIGER J.: Thrombin-induced exposure and prostacyclin inhibition of the receptor for factor VIII/von Willebrand factor on human platelets. *J Clin Invest* 69: 1212-1222, 1982.
- 35— FUJIMURA Y., HOLLAND L.Z., RUSSELL S., ROBERTS J., RUGGERI Z.M., ZIMMERMAN T.S.: Von Willebrand factor: a reduced and alkylated 52/48 KDa tryptic fragment contains the ristocetin-induced platelet binding domain: Xth International Congress on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost.* 54: 60, 1985. (Abstract).
- 36— FULCHER C.A., ZIMMERMAN T.S.: Characterization of the human factor VIII procoagulant protein with a heterologous precipitating antibody. *Proc Natl Acad Sci. USA* 79: 1648-1652, 1982.
- 37— FURLAN M., PERRET B.A., BECK E.: Reactivity of small molecular forms of human Factor VIII/von Willebrand factor with botrocetin and anti-factor VIII-coated latex particles. *Thromb Haemost* 54: 463-465, 1985.
- 38— GIDDINGS J.C., BROOKES L.R., PIORELLA F.: Immunohistological comparison of platelet factor 4 (PF4), fibronectin (Fn) and factor VIII related antigen (VIIR:Ag) in human platelet granules. *Br J Haematol* 52: 79-88, 1982.
- 39— GILL F.M.: Congenital bleeding disorders: hemophilia and von Willebrand's disease. *Med Clin N Amer* 68: 601-615, 1984.
- 40— GOUDEMAMAND J., MAZURIER C., SAMOR B., BOUQUELET S., MONTREUIL J., GOUDEMAMAND M.: Effect of carbohydrate modifications of factor VIII/von Willebrand factor on binding to platelets. *Thromb Haemost* 53: 390-395, 1985.

- 41- GRALNICK H.R.: Factor VIII/von Willebrand factor protein. Galactose, a cryptic determinant of von Willebrand factor activity. *J Clin Invest* 62: 496-499, 1978.
- 42- GRALNICK H.R., WILLIAMS S.B., MORISATO D.K.: Effect of the multimeric structure of the Factor VIII/von Willebrand Factor protein on binding of platelets. *Blood* 58: 387-397, 1981.
- 43- GRALNICK H.R., WILLIAMS S.B., RICK M.E.: Role of carbohydrate in multimeric structure of Factor VIII/von Willebrand factor protein. *Proc Natl Acad Sci. USA* 80: 2771-2774, 1983.
- 44- GRALNICK H.R., FLAUM M.A., KESSLER C.M., ZIMBLER H., COLLER B.S.: IgA inhibitor to factor VIII/von Willebrand factor. *Brit J Haematol* 59: 149-158, 1985.
- 45- GREENBERG J., PACKHAM M.A., CAZENOVE J.P.: Effects on platelet function of removal of platelet sialic acid by neuroaminidase. *Lab Invest* 32: 476-484, 1975.
- 46- HAUDIN R.I., MARTIN V., MALONEY W.C.: Antibody-induced von Willebrand's disease: a newly defined inhibitor syndrome. *Blood* 48: 393-405, 1976.
- 47- HOLMBERG L., MANNUCCI P.M., TURESSON I.: Factor VIII antigen in the vessel walls in von Willebrand's disease and hemophilia A. *Scand J Haematol* 13: 33-38, 1974.
- 48- HOLMBERG L., NILSSON I.M.: VIIIIR: Ag in platelets from patients with various forms of von Willebrand's disease. *Thromb Haemost.* 42: 1033-1038, 1979.
- 49- HOLMBERG L., NILSSON I.M., BORGE L.: Platelet aggregation induced by 1-Desamino-8-D-arginine vasopressin (DDAVP) in type II B von Willebrand's disease. *N Engl J Med* 309: 816-821, 1983.
- 50- HOWARD M.A., FIRKIN B.G.: Ristocetin. A new tool in the investigation of platelet aggregation. *Thromb Diath Haemorrh* 26: 362-369, 1971.
- 51- HOWARD M.A., MONTGOMERY D.C., HARDISTY R.M.: Factor VIII related antigen in platelets. *Thromb Res* 4: 617-624, 1974.
- 52- HOWARD M.A., PERKIN J., SALEM H.H., FIRKIN B.G.: The agglutination of human platelets by botrocetin: evidence that botrocetin and ristocetin act at different sites of the factor VIII molecule and platelet membrane. *Br J Haematol* 57: 25-35, 1984.
- 53- HOYER L.W.: Immunological studies of antihemophilia factor

- (AHF, Factor VIII). IV Radioimmunoassay of AHE antigen. *J Lab Clin Med* 80: 822-833, 1972.
- 54— HOYER L.W., RIZZA C.R., TUDDENHAM E.G.: Von Willebrand factor multimer patterns in von Willebrand's disease. *Br J Haematol* 55: 493-507, 1983.
 - 55— HULTIN M.B., LONDON F.S., SHAPIRO S.S., YOUNT W.J.: Heterogeneity of factor VIII antibodies: further immunochemical and biologic studies. *Blood* 49: 807-817, 1977.
 - 56— INGRAM G.I.: Blood coagulation factor 8: genetics physiologic control and bioassay. *Advances Clin Chem* 8: 189-236, 1965.
 - 57— ITALIAN WORKING GROUP: Spectrum of von Willebrand's disease: A study of 100 cases. *Br J Haematol* 35: 101-112, 1977.
 - 58— JAFFE E.A., HOYER L.W., NACHMAN R.L.: Synthesis of anti-hemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 52: 2757-2764, 1973.
 - 59— JENKINS C.S.P., PHILLIPS D.R., CLEMETSON K.J.: Platelet membrane glycoproteins implicated in ristocetin-induced aggregation. *J Clin Invest* 57: 112-124, 1976.
 - 60— KAO K.J., PIZZO S.V., MCKEE P.: Factor VIII/von Willebrand protein. Modification of its carbohydrate causes reduced binding of platelets. *J Biol Chem* 255: 10134-10139, 1980.
 - 61— KINOSHITA S., HARRISON J., LAZERSON J., ABILDGAARD C.F.: A new variant of dominant type II von Willebrand's disease with aberrant multimeric pattern of factor VIII-related antigen (type IID). *Blood* 63: 1369-1371, 1984.
 - 62— KIRBY E., MILLS D.C.B.: The interaction of bovine factor VIII with human platelets. *J Clin Invest* 56: 491-502, 1975.
 - 63— KOUTTS E., LEE H., MERLIN F.: Active release of human platelet factor VIII-related antigen by adenosine diphosphate, collagen and thrombin. *J Clin Invest* 62: 1255-1263, 1978.
 - 64— LAURELL C.: Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal Biochem* 15: 45-52, 1966.
 - 65— LAZARCHICK J., HOYER L.W.: Immunoradiometric measurement of the factor VIII Procoagulant antigen. *J Clin Invest* 62: 1042-1052, 1978.

- 66— LAZARCHICK J., PAPPAS A.A., KIZER J., HALL S.A.: Acquired von Willebrand syndrome due to an inhibitor specific for von Willebrand factor antigens. *Am J Hematol* 21: 305-314, 1986.
- 67— LEON L.: Pseudohemofilia. *Invest Clín N° 15*: 15-24, 1963.
- 68— LEYTIN V.L., GORBUNOVA N.A., MISSELWITZ F.: Step by step analysis of adhesion of human platelets to a collagen coated surface defect in initial attachment and spreading of platelets in von Willebrand's disease. *Thromb Res.* 34: 51-63, 1984.
- 69— LOPEZ-FERNANDEZ M.F., GINSBERG M.H., RUGGERI Z.M.: Multimeric structure of platelet Factor VIII/von Willebrand factor. The presence of larger multimers and their reassociation with thrombin stimulated platelets. *Blood* 60: 1132-1138, 1982.
- 70— LYNCH D.C., WILLIAMS R., KIRBY E., ZIMMERMAN T., LIVINGSTON D.M.: Mechanisms of FVIII (von Willebrand factor) synthesis by bovine endothelial cells. *Clin Res* 30: 506A, 1982.
- 71— LYNCH D.C., WILLIAMS R., ZIMMERMAN T.S.: Biosynthesis of the subunits of Factor VIII by bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2738-2742, 1983.
- 72— MANCINI G., CARBONARA A.O., HEREMANS J.F.: Immunochemical quantitation of antigens by single radioimmunodiffusion. *Immuno-Chem* 2: 235, 1965.
- 73— MANNUCCI P.M., ABERG M., NILSON M., ROBERTSON B.: Mechanisms of plasminogen activator and factor VIII increase after vasoactive drugs. *Brit-J Haematol* 30: 81-93, 1975.
- 74— MANNUCCI P.M., LOMBARDI R., BADER R., HORELLOU M.H., FINAZZI G., BESAM C., CONRAD J., SAMAMA M.: Studies on the pathophysiology of acquired von Willebrand's disease in seven patients with lymphoproliferative disorders or benign monoclonal gammopathies. *Blood* 64: 614-621, 1984.
- 75— MANNUCCI P.M., LOMBARDI R., FEDERICI A.B., ZIMMERMAN T.S., RUGGERI Z.M.: A new variant of type II von Willebrand disease with aberrant multimeric structure of von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 54: 189, 1985.
- 76— MANNUCCI P.M., LOMBARDI R., BADER R., VIANELLO L., FEDERICI A.B., SOLIMAS S., MAZZUCCON M.G., MARIANI G.: Heterogeneity of type I von Willebrand disease: Evidence for a subgroup with an abnormal von Willebrand factor. *Blood* 66: 796-802, 1965.

- 77- MARTIN S.E., MARDER V.J., FRANCIS C.W., LOFTUS L.S.,
BARLOW G.H.: Enzymatic degradation of the Factor VIII-von
Willebrand protein: A unique tryptic fragment with ristocetin co-
factor activity. *Blood* 55: 848-858, 1980.
- 78- MAC FARLANE D.E., STIBBE J., KIRBY E.P.: A method for
assaying von Willebrand Factor (ristocetin cofactor). *Thromb Diath
Haemorrh* 34: 306-308, 1975.
- 79- MCGRATH K.M., JOHNSON C.A., STUART J.J.: Acquired von
Willebrand disease associated with an inhibitor to factor VIII antigen
and gastrointestinal telangiectasia. *Am J Med* 67: 693-696, 1979.
- 80- MEUCCI P., PEAKE I.R., BLOOM A.L.: Factor VIII related activi-
ties in normal, haemophilic and von Willebrand's disease platelet
fractions. *Thromb Haemost* 40: 288-301, 1978.
- 81- MEYER D., FROMMEL D., LARRIEU M.J., ZIMMERMAN T.S.:
Selective absence of large forms of factor VIII-von Willebrand factor
in acquired von Willebrand's syndrome. Response to transfusion.
Blood 55: 600-606, 1979.
- 82- MIELKE C.H., KANESHIRO M.M., MAKER J.A., WEINER J.M.,
RAPAPORT S.I.: The standardized normal bleeding time and its
prolongation by aspirin. *Blood* 34: 204-215, 1969.
- 83- MICHELSON A.D., LOSCALZO J., MELNICK B., COLLER B.S.,
HANDIN R.I.: Partial characterization of a binding site for von
Willebrand factor on glyocalicin. *Blood* 67: 19-26, 1986.
- 84- MILLER J.L., CASTELLA A.: Platelet-type von Willebrand's dis-
ease: characterization of a new bleeding disorder. *Blood* 60: 790-
794, 1982.
- 85- MILLER J.L., KUPINSKI J.M., CASTELLA A.: Von Willebrand
factor binds to platelets and induces aggregation in platelet-type but
not type IIB von Willebrand disease. *J Clin Invest* 72: 1532-1542,
1983.
- 86- MILLER J.L., RUGGERI Z.M.: Asialo-von Willebrand factor inter-
actions with platelets from patients with platelet-type von Wille-
brand's disease. *Thromb Haemost* 54: 189, 1985.
- 87- MOAKE J.L., OLSON J.K., TROLL J.H., TANG S.S., FUNICELLA
T., PETERSON D.M.: Binding of radioiodinated human von Wille-
brand factor to Bernard-Soulier, Thrombasthenic and von Wille-
brand's platelets. *Thromb Res* 19: 21-27, 1980.

- 88— MOAKE J.L., RUDY C.K., TROLL J.H., WEINSTEIN M.J., COLANNINO N.M., AZOCAR J., SEDER R.H., HONG S.L., DEYKIN D.: Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 307: 1432-1435, 1982.
- 89— MOAKE J.L., BYRNES J.J., TROLL J.H., RUDY C.K., WEINSTEIN M.J., COLANNINO N.M., HONG S.L.: Abnormal VIII: von Willebrand factor patterns in the plasma of patients with the hemolytic-uremic syndrome. *Blood* 64: 592-598, 1984.
- 90— MORISATO D.K., GRALNICK H.R.: Selective binding of the factor VIII/von Willebrand factor protein to human platelets. *Blood* 55: 9-15, 1980.
- 91— MORTON L.F., GRIFFIN B., PEPPER D.S.: The interaction between colagens and factor VIII/von Willebrand factor: Investigation of the structural requirements for interaction. *Thromb Res* 32: 545-556, 1983.
- 92— NACHMAN R.L., JAFFE E.A.: Subcellular platelet factor VIII antigen and von Willebrand factor. *J Exp Med* 141: 1101-1113, 1975.
- 93— NACHMAN R.L., LEVINE R., JAFFE E.A.: Synthesis of factor VIII antigen by cultured guinea-pig megakaryocytes. *J Clin Invest* 60: 914-921, 1977.
- 94— NACHMAN R.L., JAFFE E.A., FERRIS B.: Peptide map analysis of normal plasma and platelet factor VIII antigen. *Biochem Biophys Res Commun* 92: 1208-1214, 1980.
- 95— NAGLE R., WITTE M., WITTE C., WAY D.: Factor VIII associated antigen in canine lymphatic endothelium. *Lymphology* 18: 7-8, 1985.
- 96— OWEN C.A. Jr., BOWIE E.J., FASS D.N., PEREZ R.A., COLE T.L., STEWART M.: Hypofibrinogenemia-dysfibrinogenemia and von Willebrand's disease in the same family. *Mayo Clin Proc* 54: 375-380, 1979.
- 97— PEAKE I.R., BLOOM A.L.: Immunoradiometric assay of pro-coagulant factor VIII antigen in plasma and serum and its reduction in hemophilia. Preliminary studies on adult and fetal blood. *Lancet* 1: 473-475, 1978.
- 98— PICKERING N.J., BRODY J.I., BARRETT M.J.: Von Willebrand syndrome and mitral-valve prolapse. *New Engl J Med* 305: 131-134, 1981.

- 99— PLOW E.F., McEVER R.P., COLLER B.S., WOODS V.L., MARGUERIE G.A., GINSBERG M.H.: Related binding mechanisms for fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor and thrombospondin on thrombin-stimulated human platelets. *Blood* 66: 724-727, 1985.
- 100— QUICK A.J.: Telangiectasia: its relationship to the Minot-von Willebrand syndrome. *Am J Med Sci.* 254: 585-601, 1967.
- 101— RAPAPPORT S.I., SCHIFFMAN S., PATH M.J., WARE A.G.: A simple, specific one stage assay for plasma thromboplastin antecedent (PTA) activity. *J Lab Clin Med* 51: 771-780, 1961.
- 102— READ M.S., SHERMER R.W., BRINKHOUS K.M.: Venom coagglutinin: An activator of platelet aggregation dependent on von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci. USA* 75: 4514-4518, 1978.
- 103— REISNER H.M., KATZ H.J., GOLDIN L.R., BARROW E.S., GRAHAM J.B.: Use of a simple visual assay of Willebrand factor for diagnosis and carrier identification. *Br J Haematol* 40: 339-350, 1978.
- 104— REISNER H.M., BARROW E.S., GRAHAM J.B.: Radioimmunoassay for coagulant factor VIII related antigen (VIII:CAg). *Thromb Res* 14: 235-239, 1979.
- 105— ROSBOROUGH T.K., SWAIM W.R.: Acquired von Willebrand's disease, platelet release defect and angiodysplasia. *Am J Med* 65: 96-100, 1978.
- 106— RUGGERI Z.M., MANNUCCI P.M., JEFFCOATE S.L.: Immunoradiometric assay of factor VIII related antigen, with observations in 32 patients with von Willebrand's disease. *Br J Haematol* 33: 221-232, 1976.
- 107— RUGGERI Z.M., MANNUCCI P.M., BADER R., BARBUI T.: Factor VIII related properties in platelets from patients with von Willebrand's disease. *J Lab Clin Med.* 91: 132-140, 1978.
- 108— RUGGERI Z.M., ZIMMERMAN T.S.: Variant von Willebrand's disease: Characterization of two subtypes by analysis of multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor in plasma and platelets. *J Clin Invest* 65: 1318-1325, 1980.
- 109— RUGGERI Z.M., PARETI F., MANNUCCI P.M.: Heightened interaction between platelets and Factor VIII/von Willebrand factor in plasma and platelets. *New Engl J Med* 302: 1043-1051, 1980.

- 110— RUGGERI Z.M., ZIMMERMAN T.S.: The complex multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor. *Blood* 57: 1140-1143, 1981.
- 111— RUGGERI Z.M., MANNUCCI P.M., FEDERICI A.B.: Multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor following administration of DDAVP: Implications for pathophysiology and therapy of von Willebrand's disease subtypes. *Blood* 59: 1272-1278, 1982.
- 112— RUGGERI Z.M., NIELSSON I.M., LOMBARDI R.: Aberrant multimeric structure of von Willebrand factor in a new variant of von Willebrand's disease (type IIC). *J Clin Invest* 70: 1124-1127, 1982.
- 113— RUGGERI Z.M., BADER R., DE MARCO L.: Glanzmann thrombasthenia: Deficient binding of von Willebrand factor to thrombin-stimulated platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 6038-6041, 1982.
- 114— RUGGERI Z.M., BADER R., PARETI F.I., MANNUCCI L., ZIMMERMAN T.S.: High affinity interaction of platelet von Willebrand factor with distinct platelet membrane sites. *Clin Res* 31: 322A, 1983.
- 115— RUGGERI Z.M., DE MARCO L., GATTI L.: Platelets have more than one binding site for von Willebrand Factor. *J Clin Invest* 72: 1-12, 1983.
- 116— RUGGERI Z.M., ZIMMERMAN T.S.: Platelets and von Willebrand Disease. *Semin Hematol* 22: 203-218, 1985.
- 117— SABA H.I., SABA S.R., DENT J., RUGGERI Z.M., ZIMMERMAN T.S.: Type IIB Tampa: A variant of von Willebrand Disease with chronic thrombocytopenia. Circulating platelet aggregates, and spontaneous platelet aggregation. *Blood* 66: 282-286, 1985.
- 118— SAKARIASSEN K.S., BOLHUIS P.A., SIXMA J.J.: Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII-von Willebrand factor bound to the subendothelium. *Nature* 279: 636-638, 1979.
- 119— SALZMAN E.W.: Measurement of platelet adhesiveness: a simple in vitro technique demonstrating an abnormality in von Willebrand's disease. *J Lab Clin Med.* 62: 724-735, 1963.
- 120— SANTORO S.A.: Adsorption of von Willebrand factor/factor VIII by genetically distinct interstitial collagens. *Throm Res* 21: 689-693, 1981.

- 121- SCOTT D.M., GRIFFIN B., PEPPER D.S., BARNES M.J.: The binding of purified factor VIII/von Willebrand factor to collagens of differing type and form. *Thromb Res* 24: 467, 1981.
- 122- SCOTT J.P., MONTGOMERY R.R., TUBERGEN D.G., HAYS T.: Acquired von Willebrand's disease in association with Wilms tumor. Regression following treatment. *Blood* 58: 665-669, 1981.
- 123- SENOGLES S.E., NELSESTNEN G.L.: Von Willebrand Factor. A protein which binds at the cell surface interface between platelets. *J Biol Chem* 258: 12327-12333, 1983.
- 124- SHOAI I., LAVERGNE J.M., ARDILLON N.: Heterogeneity of von Willebrand's disease. Study of 40 Iranian cases. *Br J Haematol.* 37: 67-83, 1977.
- 125- SIMONE J.V., CORNET J.A., ABILGAARD C.F.: Acquired von Willebrand's syndrome in systemic lupus erythromatosus. *Blood* 31: 806-812, 1968.
- 126- SITBAN N., HORELLON M.H., CONRAD J., PERROT J.Y., SAMAMA M., FINE J.M., GOIM N.C.: Déficit acquis en facteur Willebrand associé à une gammapathie monoclonale IgG kappa. *Nouv Presse Med* 10: 2171-2174, 1981.
- 127- SIXMA J.J., SAKARIASSEN K.S., BEESER-VISSER N.H.: Adhesion of platelets to human artery subendothelium: effect of factor VIII-von Willebrand factor of various multimeric composition. *Blood* 63: 128-139, 1984.
- 128- SIXMA J.J., SAKARIASSEN K.S., STEL H.V., HOUDIJK W.P.M., INDER MAUR D.W., HAMER R.J., DE GROOT P.G., VAN MOURIK J.A.: Functional domains on von Willebrand factor. *J Clin Invest* 74: 736-744, 1984.
- 129- SLOT J.W., BOUMA B.N., MONTGOMERY R., ZIMMERMAN T.S.: Platelet factor VIII related antigen: Immunofluorescent localization. *Thrombs Res* 13: 871-881, 1978.
- 130- STEL H.V., SAKARIASSEN K.S., DE GROOT P.G., VAN MOURICK J.A., SIXMA J.J.: Von Willebrand factor in the vessel wall mediates platelet adherence. *Blood* 65: 85-90, 1985.
- 131- SULTAN Y., SIMEON J., CAEN J.P.: Detection of heterozygotes in both parents of homozygous patients with von Willebrand's disease. *J Clin Pathol* 28: 309-316, 1975.
- 132- SULTAN Y., BOUMA B.N., DE GRAAF S.: Factor VIII related

antigen in platelets of patients with von Willebrand's disease. *Thromb Res* 11: 23-30, 1977.

- 133-- SULTAN Y., MAISONNEUVE P., ANGELES-CANO E.: Release of VIII^R: Ag and VIII^R: WF during thrombin and collagen induced aggregation. *Thromb Res* 15: 415-425, 1979.
- 134-- SUSSMAN I.I., RAUD J.H.: Subendothelial deposition of von Willebrand's factor requires the presence of endothelial cells. *J Lab Clin Med* 100: 526-532, 1982.
- 135-- SUZUKI K., NISHIOKA J., HASHIMOTO S.: The influence of 2-mercapotoethanol on von Willebrand factor and bovine platelet aggregating factor. *Thromb Res* 17: 443-452, 1980.
- 136-- TAKAHASI H., SHIBATA A.: Agglutination of platelet-type von Willebrand's disease platelets by bovine von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 53: 204-207, 1985.
- 137-- TANOWE K., JUNG S.M., YAMAMOTO N., YAMAZAKI H.: Neutralization of the local negative charge carried by glycoprotein (GP)-Ib in ristocetin-induced platelet agglutination. *Thromb Haemost* 51: 79-83, 1984.
- 138-- TIMMONS S., KLOCZEWIAK M., HAWIGER J.: ADP-dependent common receptor mechanisms for binding of von Willebrand factor and fibrinogen to human platelets. *Proc Natl Acad Sci. USA* 81: 4935-4939, 1984.
- 139-- TRAN-THANG C., MANNUCCI P.M., SCHNEIDER P.H., FEDERICI A., BACHNIANN F.: Profound alterations of the multimeric structure of von Willebrand factor in a patient with malignant lymphoma. *Brit J Haematol* 61: 307-314, 1985.
- 140-- TSCHOPP T.B., WEISS H.J., BAUMGARTNER H.R.: Decreased adhesion of platelets to subendothelium in von Willebrand's disease. *J Lab Clin Med* 83: 296-301, 1974.
- 141-- TUDDENHAM E.G.D., TRABOLD N.C., COLLINS J.A., HOYER L.W.: The properties of factor VIII coagulant activity prepared by immunoadsorbent chromatography. *J Lab Clin Med* 93: 40-53, 1979.
- 142-- TURITTO V.T., WEISS H.J., SUSSMAN I.I.: Factor VIII in vessel wall influences platelet interaction with subendothelium. *Thromb Haemost* 46: 199, 1981.
- 143-- TURITTO V.T., WEISS H.J., ZIMMERMAN T.S., SUSSMAN I.I.:

Factor VIII/von Willebrand factor in subendothelium mediates platelet adhesion. *Blood* 65: 823-831, 1985.

- 144— ULRICH B., SCHAEFER G., MUELLER N., EGLI H., DENT J., RUGGERI Z., ZIMMERMAN T.: Acquired von Willebrand's disease in the myeloproliferative syndrome. *Blood* 64: 981-985, 1984.
- 145— VELTKAMP J.J., VAN TILBURG N.H.: Detection of heterozygotes for recessive von Willebrand's disease by the assay of anti-hemophilic-factor-like antigen *N Engl J Med* 289: 882-885, 1973.
- 146— VERMYLEN J., BOTTECHIA D., SZPILMAN H.: Factor VIII and human platelet aggregation III. Further studies on aggregation of human platelets by neuraminidase-treated human factor VIII. *Br J Haematol* 34: 321-330, 1976.
- 147— VON WILLEBRAND E.A.: Hereditare Pseudohamophilic. *Finska Lak Salkk Handl* 68: 87, 1926.
- 148— WAGNER D.D., URBAN-PICKERING M., MARDER V.J.: Von Willebrand protein binds to extracellular matrices independently of collagen. *Proc Natl Acad Sci. USA* 81: 471-475, 1984.
- 149— WAGNER D.D., MARDER V.J.: Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells. Identification of a large precursor polypeptide chain. *J Biol Chem* 258: 2065-2067, 1984.
- 150— WARRIER I., LUSTER J.M.: Desmopressin (DDAVP) for maintaining hemostasis at surgery in hemophilia A and von Willebrand's disease. *Thromb Haemost* 54: 208, 1985.
- 151— WAUTIER J.L., LEVY-TOLEDANO S., CAEN J.P.: Acquired von Willebrand's syndrome and thrombopathy in patient with chronic lymphocytic leukemia. *Scand J Haematol* 16: 128, 1976.
- 152— WEISS H.J., ROGERS J., BRAND H.: Defective ristocetin-induced platelet aggregation in von Willebrand's disease and its correction by factor VIII. *J Clin Invest* 52: 2697-2707, 1973.
- 153— WEISS H.J., HOYER L.W., RICKLES F.R.: Quantitative assay of plasma factor deficient in von Willebrand's disease that is necessary for platelet aggregation. Relationship to factor VIII procoagulant activity and antigen content. *J Clin Invest* 52: 2708-2716, 1973.
- 154— WEISS H.J., SUSSMAN I.I., HOYER L.W.: Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. *J Clin Invest* 60: 390-404, 1977.

- 155-- WEISS H.J., MEYER D., RABINOWITZ R., PIETU G., GIRMA J.P., VICIC W.J., ROGERS J.: Pseudo-von Willebrand's disease. An intrinsic platelet defect with aggregation by unmodified human factor VIII/von Willebrand factor and enhanced adsorption of its high-molecular-weight multimers. *N Engl J Med* 306: 326-332, 1982.
- 156-- ZIMMERMAN T.S., RUGGERI Z.M., FULCHER C.A.: Factor VIII/von Willebrand factor. In: *Progress in Hematology*, Vol 3 pg 279-309. Brown EB (ed): Grune & Straton, New York, 1983.
- 157-- ZUCKER M.B., BROEKMAN M.J., KAPLAN K.L.: Factor VIII-related antigen in human blood platelets. Localization and release by Thrombin and collagen. *J Lab Clin Med.* 94: 675-682, 1979.
-