

DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND

INTRODUCCIÓN:

La enfermedad de Von Willebrand (EvW) es un trastorno hemorrágico hereditario caracterizado por una adhesión y agregación plaquetaria defectuosas.

Fue descrito por primera vez en 1926 por Erik von Willebrand, y lo llamó "pseudohemofilia hereditaria", y es causada por una deficiencia en la concentración, estructura y función del factor de von Willebrand (FvW).

El FvW es una glicoproteína multimérica de alto peso molecular que actúa uniéndose al colágeno en los sitios de lesión vascular, media la adhesión y agregación de las plaquetas; y sirve además como proteína portadora para el factor VIII de la coagulación (FVIII). También está implicado en procesos inflamatorios y de angiogénesis. Es sintetizado en las células endoteliales y en los megacariocitos, y es almacenado en los cuerpos de Weibel-Palade y en los gránulos alfa respectivamente.

La EvW es el trastorno hemorrágico hereditario más común y tiene un patrón de herencia autosómico (dominante o recesivo), aunque también se presenta, raramente, de forma adquirida. Su prevalencia estimada es de 1 caso por 10.000 habitantes y se caracteriza principalmente por sangrado asociado a mucosas y sangrado después de cirugía o trauma. El diagnóstico se basa en un historial personal o familiar de hemorragia y pruebas de laboratorio de anomalías en el FvW, el FVIII o ambos que se realizan en forma secuencial como detallaremos más adelante.

CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD:

Tipos:

La enfermedad de von willebrand se subdivide en 3 tipos:

- Tipo 1 (70-80% de los casos): déficit cuantitativo parcial de FvW
- Tipo 2 (20%): asociado a un déficit cualitativo y a anomalías funcionales del FvW. Se han descrito cuatro subtipos dentro del tipo 2: 2A, 2B, 2M y 2N. Tres de estos subtipos están asociados con anomalías en la interacción del FvW con las plaquetas y/o el subendotelio y están causadas por: un defecto en la multimerización del FvW (tipo 2A), un aumento de la afinidad del FvW por las plaquetas (tipo 2B) o una disminución de la afinidad del FvW por las plaquetas (tipo 2M). El cuarto subtipo (tipo 2N) está asociado con una disminución de la afinidad del FvW por el FVIII.
- Tipo 3 (<5%): déficit cuantitativo completo de FvW circulante. Síntomas de sangrado más severos.

Herencia:

La herencia de la EvW tipo 1 leve suele ser autosómica dominante, con expresión variable y penetrancia incompleta. El patrón de herencia de la EvW tipo 3 es autosómico recesivo. Y en general el EvW tipo 2, el patrón de herencia es principalmente autosómico dominante, pero a diferencia del tipo 1, es completamente penetrante; excepto el tipo 2N que presenta una herencia de patrón recesivo.

Presentación clínica:

La enfermedad de von Willebrand se diagnostica comúnmente en la infancia o en la adolescencia, especialmente en las adolescentes, ya que puede llevar a una menorragia significativa. Más del 80% de las mujeres con EvW refieren una pérdida excesiva de sangre

Catlab Informa

durante el ciclo menstrual y más del 20% terminan sometiéndose a una histerectomía, una proporción que es el doble que en la población general. Sin embargo, no es infrecuente que pasen muchos años antes del diagnóstico, por lo que debería haber un alto índice de sospecha incluso en adultos que presentan síntomas de sangrado.

Los síntomas varían entre pacientes, dependiendo de los niveles de actividad de FvW, el subtipo, la edad y sexo. El sangrado mucocutáneo es el tipo más común de hemorragia clínica, que a menudo se manifiesta como epistaxis, gingivorragia, púrpura, petequias, menorragia y hemorragia gastrointestinal.

En niños, los síntomas más frecuentes suelen ser hematomas y epistaxis; en adultos, hematomas, metrorragia y sangrado en pequeñas heridas. La hemorragia postparto suele ocurrir frecuentemente.

La mayoría de los pacientes presentan antecedentes de sangrado en extracciones dentales o en otras intervenciones.

Las complicaciones hemorrágicas gastrointestinales son frecuentes en gente anciana, sobre todo por angiodisplasia, y pueden llegar a ser mortales.

Hemartrosis, aunque sea más frecuente en paciente hemofílicos, puede estar presente en paciente con tipos 2N y 3.

DIAGNÓSTICO CLÍNICO:

La valoración inicial debería tomar en cuenta el historial personal y familiar de manifestaciones hemorrágicas y sus características tales como espontaneidad, gravedad y localización. Para facilitar el diagnóstico de los trastornos de la coagulación se han desarrollado diversas herramientas, algunas de las cuales son generales y otras específicas según los síntomas como por ejemplo:

- *Compendio de herramientas de valoración* de la Federación Mundial de Hemofilia (FMH) que ofrece evaluaciones de las herramientas más útiles en el ejercicio actual; como por ejemplo, el cuestionario sobre hemorragias en los *Marcadores moleculares y clínicos para el diagnóstico y tratamiento del tipo 1 de la EvW (MCMDM-1)*, y la *Evaluación pictórica (o pictograma) de pérdida de sangre (PBAC)*.
- *Herramienta de valoración de hemorragias (BAT por sus siglas en inglés)* de La Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH). Este instrumento resulta útil en el entorno médico ya que puede ser usado para evaluar EvW o disfunción plaquetaria en pacientes que se sospecha pudieran padecer estos trastornos. Además, sirve para racionalizar la investigación de las hemorragias en el laboratorio y para evaluar la propensión de los pacientes a las mismas.

Como anexo a esta revisión, adjuntamos el BAT condensado (Anexo 1) y el score de puntuación del MCMDM-1 (Anexo 2).

CONSIDERACIONES PREVIAS AL ESTUDIO DE LABORATORIO:

Antes de abordar las pruebas propiamente dichas, es muy importante mencionar los problemas y consideraciones con respecto a los análisis de laboratorio, que se deben de tener en cuenta:

Tipos de sangre ABO y envejecimiento:

El grupo sanguíneo ABO tiene un efecto importante en las concentraciones plasmáticas de FvW y FVIII. Los sujetos con grupo sanguíneo tipo O tienen concentraciones de FvW cerca de 25% más bajas que personas con otros grupos, como consecuencia de la mayor depuración del FvW. Los niveles tanto de FvW como de FVIII aumentan con la edad. En adultos, el FvW se incrementa en aproximadamente 1% a 2% por año.

Catlab Informa

Problemas previos a los análisis:

La fase preanalítica abarca diversos procedimientos, desde preparación del paciente hasta recolección, manejo, transporte y almacenamiento de muestras. La fase preanalítica es considerada la parte más vulnerable de la totalidad del proceso de pruebas, y los problemas preanalíticos representan cerca del 70% de los errores de los laboratorios clínicos. Antes de las pruebas de laboratorio es importante tomar en cuenta el historial clínico del paciente a fin de detectar cualquier situación patológica que se sabe puede afectar los niveles de FvW; por ejemplo, enfermedades cardiovasculares, trastornos autoinmunes, cáncer, enfermedades linfoproliferativas o mieloproliferativas, e hipotiroidismo. También deben tomarse en cuenta embarazo y uso de estrógeno, anticonceptivos orales ya que están relacionados con un incremento en los niveles de FvW y otros factores de la coagulación. Es importante evitar el estrés; por ejemplo, ansiedad o llanto en el caso de niños asustados, antes de tomar la muestra de sangre ya que incrementan las proteínas de fase aguda, entre ellas FvW y FVIII. No se recomienda el ejercicio físico en las 2 horas previas a la extracción de sangre y los sujetos deberían permanecer un mínimo de cinco minutos de reposo antes de la toma. Otros factores externos, tales como inflamación y cirugía, incrementan los niveles plasmáticos de FvW. Por consiguiente, es necesario repetir las pruebas en sujetos en los que se sospecha la EvW y los bajos niveles de FvW deben confirmarse con por lo menos dos tomas de sangre en ocasiones diferentes.

Recolección, manejo y transporte de muestras:

El Colegio de Patólogos Estadounidenses (CAP), así como el Instituto de Estandarización de Laboratorio Clínico (CLSI), recomiendan la recolección de sangre en una solución tamponada de citrato al 3.2%. Después de la recolección es importante mezclar inmediatamente la sangre mediante inversión a fin de garantizar la distribución del anticoagulante: debe evitarse agitarla ya que esto induce la hemólisis y/o la activación de plaquetas y factores.

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

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

Las muestras congeladas pueden deteriorarse durante el transporte; se recomienda su entrega rápida y las alícuotas deberían entregarse en hielo seco. Para evitar la formación de crioprecipitado, antes de realizar las pruebas, las muestras de plasma congelado deberían descongelarse durante por lo menos cinco minutos en un baño de agua a una temperatura de 37°C. Después de esto, las muestras deberían homogeneizarse suavemente.

DIAGNÓSTICO FENOTÍPICO DE LA EvW:

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

Catlab Informa

es necesario realizar paso a paso, como se describe a continuación. La valoración de laboratorio inicial de la hemostasia abarca hemograma completo, tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA), tiempo de protrombina (TP), y fibrinógeno. Estas pruebas no pueden excluir o confirmar la presencia de EvW, pero pueden indicar si una deficiencia de factor de coagulación pudiera ser la causa potencial de los síntomas hemorrágicos de un paciente. Dado que los pacientes con EvW tipo 2B pueden presentar trombocitopenia, debe valorarse el recuento plaquetario. En la EvW, la deficiencia de FVIII es secundaria a la deficiencia o disfunción del FvW, su proteína portadora. Por lo tanto, en la EvW los resultados del TTPA son prolongados solamente si el nivel de FVIII es lo suficientemente reducido (EvW tipo 3 o EvW tipo 2N). En algunos laboratorios también se realizan los ensayos de tiempo de sangría (TS) y analizador de la función plaquetaria (PFA100®). No obstante, los resultados del TS son susceptibles a la variabilidad del operador, y la prueba también carece de sensibilidad por lo que actualmente esta técnica ya no se realiza. Algunos estudios han demostrado que los resultados del ensayo PFA-100® son anormales en la mayoría de los pacientes con EvW; sin embargo, el ensayo PFA-100® carece de sensibilidad y especificidad para usarse como única prueba de detección.

Pruebas de primer nivel para el diagnóstico de la EvW:

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

FVIII:C

La FVIII:C se determina mediante un ensayo cromogénico, un ensayo de coagulación de una etapa basado en el ensayo de TTPA, o mediante un ensayo de coagulación de dos etapas. Entre estos, los más comunes son el ensayo de coagulación, que mide la capacidad del FVIII de un paciente para reducir el tiempo de coagulación de plasma deficiente en FVIII.

FvW:Ag

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

Actividad de unión del FvW al receptor plaquetario GPIIb α :

Generalmente se valora mediante el ensayo FvW:RCo, que mide la capacidad del FvW plasmático para aglutinar a las plaquetas en presencia de ristocetina. Durante los últimos diez años se han incorporado nuevos ensayos para valorar la actividad de unión del FvW al receptor plaquetario GPIIb α a fin de superar las limitaciones del ensayo FvW:RCo. Por lo tanto, el Comité Científico y de Estandarización (SSC) de la ISTH aprobó una nueva nomenclatura que facilita la distinción entre ensayos que difieren en sus detalles funcionales. La nomenclatura de consenso clasifica los ensayos que miden la actividad de unión del FvW al receptor plaquetario GPIIb α de la siguiente manera:

1) Ensayos FvW:RCo. Hay diferentes métodos, desde manuales a totalmente automatizados. Estas pruebas utilizan plaquetas intactas en diferentes formas (nativas, fijadas en formalina o liofilizadas reconstituidas) y ristocetina. No obstante, estos ensayos presentan algunas limitaciones, tales como un elevado coeficiente de variación que puede superar el 30% cuando los valores son <15 UI/dl, variabilidad de la ristocetina o del reactivo plaquetario de un lote a otro y una inestabilidad intrínseca del sistema de ensayo. Una desventaja más es que el ensayo FvW:RCo mide dos parámetros: 1) la unión de la ristocetina al FvW; 2) la unión del FvW “activado” por la ristocetina a las plaquetas. Se han descrito dos variantes en la región de unión

Catlab Informa

para la ristocetina que provocan falsas reducciones en los niveles de FvW:RCo. No obstante, el ensayo FvW:RCo se utiliza ampliamente y sigue siendo aceptado como el método de referencia.

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

3) Ensayos de unión del FvW a la GPIIb α con una mutación de ganancia de función (FvW:GPIbM). Estas pruebas espontáneamente se unen al FvW sin ristocetina. Los ensayos FvW:GPIbM utilizan rGPIbM capturada en una placa ELISA o en una partícula de látex, recubierta con un mAb. Los ensayos se correlacionan con el FvW:RCo con una precisión, CV y sensibilidad mejor.

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

Pruebas de segundo nivel para el diagnóstico de la EvW

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

FvW:CB (Actividad de unión al colágeno del FvW)

La interacción del FvW con el colágeno es fundamental en condiciones de fuerte cizallamiento para que se inicie el tapón plaquetario en los sitios de lesión. El análisis de FvW:CB mide la capacidad del FvW para unirse al colágeno. Como en el caso del FvW:RCo, los resultados del FvW:CB dependen del tamaño de los multímeros del FvW, lo que quiere decir que los multímeros más grandes se unen al colágeno con mayor afinidad que los pequeños. La sensibilidad y capacidad del ensayo FvW:CB para discriminar entre subtipos de la EvW depende de la fuente y del tipo de colágeno utilizado. El ensayo FvW:CB puede usarse como sustituto del análisis de multímeros del FvW, siempre que esta última prueba no se encuentre disponible, a fin de valorar la ausencia de multímeros de alto peso molecular (MAPM). Aun si algunos estudios apuntan a que los ensayos FvW:CB pueden mejorar la diferenciación del tipo 2M de la EvW del tipo 2A, en la práctica médica y de laboratorio el ensayo FvW:CB no forma parte de las pruebas habituales para la EvW. Los defectos de unión al colágeno también se describen en la EvW tipo 2M (FvW:CB/FvW:Ag <0.6) debido a mutaciones en el dominio A3 (Figura 3). Actualmente hay diversos kits ELISA disponibles comercialmente para evaluar esta función del FvW.

RIPA (Ensayo de aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina)

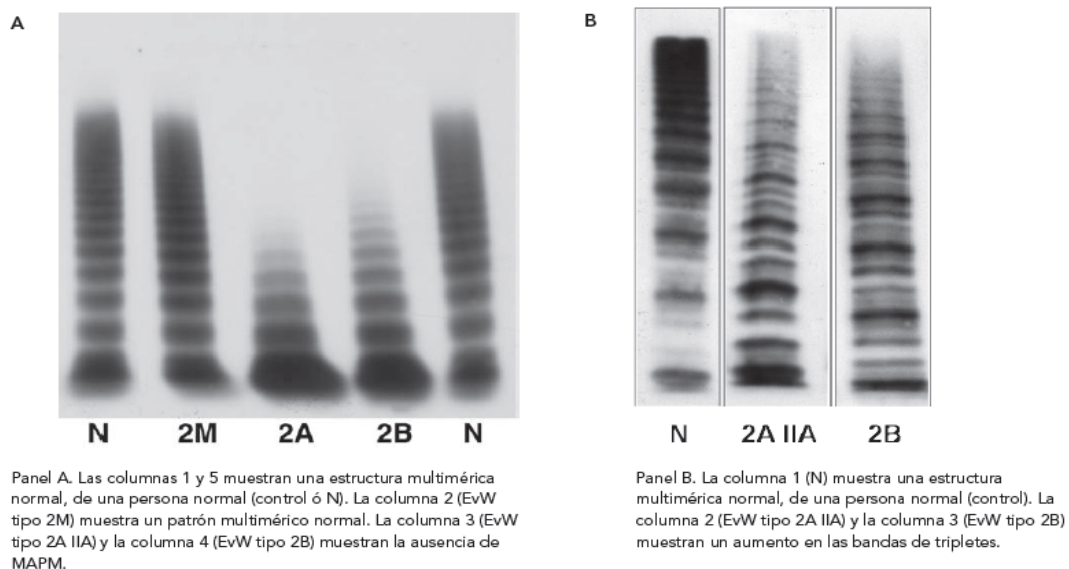
Solamente se ha informado de unos cuantos métodos que distinguen la EvW tipo 2B de otros tipos de EvW (e. g.: EvW tipo 2A o tipo 1). Entre estos métodos, la RIPA es la más utilizada. El ensayo RIPA, realizado con plasma rico en plaquetas (PRP) del paciente, evalúa la afinidad del

Catlab Informa

FvW por el receptor plaquetario GPIIb/IIIa con diferentes concentraciones de ristocetina. Por lo tanto, la disponibilidad de una muestra de sangre fresca para este ensayo es obligatoria. Bajas concentraciones de ristocetina (<0.7 mg/ml) no provocan la aglutinación de las plaquetas en el PRP de sujetos normales, mientras que la misma cantidad de ristocetina podría causar aglutinación plaquetaria en el PRP de pacientes con EvW tipo 2B. Por el contrario, a mayores concentraciones de ristocetina (entre 0.7 y 1.2 mg/ml) capaz de inducir la aglutinación plaquetaria en sujetos normales, la aglutinación plaquetaria inducida por la ristocetina está alterada en pacientes con EvW tipo 3, 2A y 2M. Mutaciones con ganancia de función en el receptor plaquetario GPIIb/IIIa provocan la EvW de tipo plaquetario (EvW-TP), también conocida como pseudo-EvW. El ensayo RIPA no permite distinguir la EvW tipo 2B de la EvW-TP; no obstante, puede determinarse un diagnóstico diferencial mediante pruebas de mezcla de plaquetas o del análisis molecular del gen del FvW y del gen de la GPIIb/IIIa.

Análisis de multímeros del FvW

El patrón multimérico del FvW plasmático es importante para su actividad funcional. Los MAPM son la forma más hemostáticamente activa del FvW. Estas moléculas se unen al colágeno y a las plaquetas con una afinidad considerablemente mayor que los multímeros de bajo peso molecular. Debido a su tamaño, los MAPM también son más eficaces para mediar la adhesión y agregación plaquetarias, especialmente en condiciones de fuerte cizallamiento. El análisis de la estructura multimérica del FvW es complejo pero útil para el diagnóstico de la EvW. El análisis multimérico de baja resolución del FvW (geles de agarosa de baja concentración) puede detectar la pérdida de MAPM (Figura 1, panel A), permitiendo distinguir a los pacientes con EvW tipo 1 de los pacientes con EvW tipo 2, y distinguir el tipo 2A de la EvW [pérdida de MAPM y multímeros de peso molecular (MPM) intermedio] del tipo 2M (patrón multimérico normal). Los geles de resolución intermedia (preparados con mayores concentraciones de agarosa) permiten observar la estructura multimérica interior, que muestra la estructura de tripletes de cada uno de los oligómeros. En una persona normal, el patrón de tripletes está formado por una banda central y dos sub-bandas externas. En algunos pacientes con EvW pueden observarse alteraciones en la estructura de tripletes (Figura 1, panel B).



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

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

FIGURA 1. Comparación de la estructura multimérica del FvW plasmático de pacientes con EvW y de personas sanas. Análisis de multímeros del FvW de resolución baja (A) e intermedia (B). Francesca Stufano. Diagnóstico de la enfermedad de Von Willebrand. Caracterización fenotípica. *FMH. Tratamiento de la Hemofilia 2017*; 55

Catlab Informa

FvW:FVIII B (Ensayo de unión del FvW al FVIII)

Evalúa la capacidad del FvW de unirse al FVIII. Este ensayo es indispensable para diferenciar un diagnóstico de EvW tipo 2N de uno de hemofilia A leve, dado que ambos trastornos están relacionados con una reducción moderada de los niveles plasmáticos de FVIII, y niveles normales de FvW:Ag y FvW:RCo (FVIII:C/FvW:Ag <1). La prueba FvW:FVIII B mide la capacidad del FvW plasmático de unirse a un FVIII exógeno, usando un inmunoensayo en fase sólida. En el diagnóstico diferencial, los resultados obtenidos de este ensayo pueden ser: 1) una capacidad de unión normal del FvW al FVIII, lo que genera un diagnóstico de hemofilia A leve; 2) una capacidad de unión marcadamente reducida del FvW al FVIII, que da lugar a un diagnóstico de EvW tipo 2N. Existe la posibilidad de un tercer resultado utilizando este ensayo: una capacidad de unión moderadamente reducida del FvW al FVIII. Este hallazgo es habitual en portadoras asintomáticas de la EvW tipo 2N, quienes generalmente presentan niveles normales de FVIII (FVIII:C/FvW:Ag >1), y también se observa en algunos pacientes con variantes IIE de la EvW tipo 2A.

Hay kits ELISA disponibles comercialmente para medir FvW:FVIII B.

Análisis del FvW intraplaquetario

Además de los cuerpos Weibel–Palade de las células endoteliales, el FvW también se almacena dentro de los gránulos α de las plaquetas. En contraste con el FvW plasmático, el FvW plaquetario está enriquecido con multímeros de FvW hemostáticamente activos de tamaño ultra grande o inusualmente grande (FvW-UL). El FvW plaquetario puede evaluarse mediante los mismos ensayos utilizados para el FvW plasmático (FvW:Ag, FvW:RCo, FvW:CB y análisis multimérico); partiendo de plasma rico en plaquetas de una muestra fresca del paciente. Hay pocos métodos disponibles para la extracción del FvW de las plaquetas, y ninguno está estandarizado. Mannucci et al. describieron tres diferentes subgrupos de pacientes con base en los niveles de FvW plaquetario: 1) ‘plaquetario bajo’: pacientes con FvW:Ag y FvW:RC plaquetarios reducidos; 2) ‘plaquetario normal’: pacientes con FvW:Ag y FvW:RCo plaquetarios dentro del rango normal; y 3) ‘plaquetario discordante’, pacientes con concentraciones normales de FvW:Ag plaquetario, pero niveles desproporcionadamente reducidos de FvW:RCo plaquetario. Se ha demostrado que estas subcategorías predicen la respuesta del FvW plasmático del paciente después de la administración de desmopresina (DDAVP)

Prueba de infusión de desmopresina

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

Proporción ppFvW/FvW:Ag

Un incremento en la proporción entre el propéptido del FvW (ppFvW) y el FvW (ppFvW/FvW:Ag), que constituye un marcador de depuración acelerada del FvW, se ha encontrado en pacientes con EvW y en pacientes con coagulación intravascular diseminada. Hay diferentes kits ELISA disponibles comercialmente para medir la concentración plasmática del ppFvW. No obstante, este ensayo es relativamente nuevo y no se utiliza ampliamente en el diagnóstico de la EvW. Evaluar la proporción ppFvW/FvW:Ag es una buena alternativa a la prueba de desmopresina a fin de investigar la tasa de depuración del FvW.

Catlab Informa

CLASIFICACIÓN FENOTÍPICA DE LA EVW

Como se mencionó anteriormente, la actual clasificación de la EvW se basa en defectos cuantitativos parciales o completos (EvW tipos 1 y 3) o defectos cualitativos (EvW tipo 2) del FvW, lo cual se puede determinar mediante las técnicas antes descritas (Ver figura 2).

EvW tipo 1

Se caracteriza por una deficiencia cuantitativa parcial de FvW. Las manifestaciones hemorrágicas se atribuyen a un decremento en la concentración de FvW. El hallazgo de laboratorio habitual son niveles reducidos de FvW con actividades funcionales normales del FvW en comparación con FvW:Ag. La proporción de MAPM en relación con la totalidad de multímeros del FvW es normal o no está particularmente reducida.

EvW tipo 2

La clasificación de la EvW tipo 2 se basa en defectos funcionales específicos del FvW que afectan la agregación y/o adhesión plaquetaria, o que afectan la supervivencia del FVIII plasmático.

EvW tipo 2A

Se caracteriza por una disminución en la adhesión del FvW dependiente de las plaquetas debido a una deficiencia selectiva de los MAPM. La pérdida de multímeros grandes se relaciona con un decremento en las interacciones FvW-plaquetas (i. e.: FvW:RCo) y en las interacciones FvW-tejido conectivo (i. e.: FvW:CB) en relación con FvW:Ag. La EvW tipo 2A constituye un grupo de variantes heterogéneas con un mecanismo patogénico molecular diferente, como explicaremos más adelante.

EvW tipo 2B

Se debe a una mayor afinidad del FvW al receptor plaquetario GPIIb α y se caracteriza por ensayo RIPA aumentado (aglutinación plaquetaria en presencia de bajas concentraciones de ristocetina). La mayor afinidad de esta variante del FvW por el receptor plaquetario GPIIb α resulta en una unión espontánea del FvW a las plaquetas in vivo, que da lugar a la formación de agregados, con la consiguiente pérdida de MAPM y, ocasionalmente, trombocitopenia. Asimismo, la interacción espontánea entre el FvW y la GPIIb α acelera el efecto proteolítico de ADAMTS-13 sobre el FvW, lo que genera una mayor disminución de MAPM.

EvW tipo 2M

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

EvW tipo 2N

Se caracteriza por una menor capacidad del FvW para unirse al FVIII. La primera descripción de esta variante fue en un paciente de la región de Normandía (por ende, la inicial N). En particular, hay una disminución del FVIII:C en comparación con el nivel normal de FvW:Ag, y el patrón multimérico del FvW es normal. Por lo tanto, la EvW tipo 2N puede diagnosticarse incorrectamente como hemofilia A leve. El diagnóstico diferencial se determina mediante un inmunoensayo en fase sólida para valorar la capacidad de unión del FvW del paciente al FVIII (FvW:FVIII:B). Como alternativa puede realizarse el análisis genético tanto del FVIII como del FvW.

Catlab Informa

EvW tipo 3

Se caracteriza por una deficiencia casi completa de FvW tanto plasmático como plaquetario. Los valores de FvW:Ag, FvW:RCo y FvW:CB son <1 IU/dl y los niveles de FVIII:C también son muy bajos (<10 IU/dl).

Síndrome von Willebrand adquirido

El síndrome von Willebrand adquirido (SvWA) es un trastorno de la coagulación poco común relacionado con defectos en la concentración, estructura o función del FvW. Se presenta en personas sin historial personal o familiar previo de hemorragias. El síndrome está relacionado con enfermedades linfoproliferativas o mieloproliferativas, enfermedades cardiovasculares, trastornos autoinmunes y cáncer, y generalmente se presenta en personas de edad avanzada. Los resultados de laboratorio para el SvWA son similares a los de la EvW y pueden abarcar disminución en los valores de FvW:Ag, FvW:RCo y FVIII:C. La distribución de los multímeros del FvW puede ser normal, pero podría haber ausencia de MAPM, como ocurre en la EvW tipo 2A. Una mayor depuración del FvW plasmático es uno de los mecanismos patogénicos que se han propuesto para explicar la deficiencia de FvW en pacientes con SvWA. Los autoanticuerpos desempeñan un papel en la patogénesis de algunos pacientes con SvWA, especialmente en quienes padecen trastornos linfoproliferativos. En contraste con la hemofilia adquirida, diversos mecanismos patogénicos pueden causar trastornos estructurales o funcionales del FvW. Entre estos se cuentan autoanticuerpos que interfieren ya sea con la función plaquetaria o con la unión al colágeno, o aumentando la depuración del FvW plasmático del paciente. Solamente 20% de los pacientes con SvWA tienen anticuerpos contra el FvW, lo cual indica que los métodos disponibles podrían no ser adecuadamente sensibles para detectar anticuerpos o que el SvWA pudiera no siempre tener una base autoinmune.

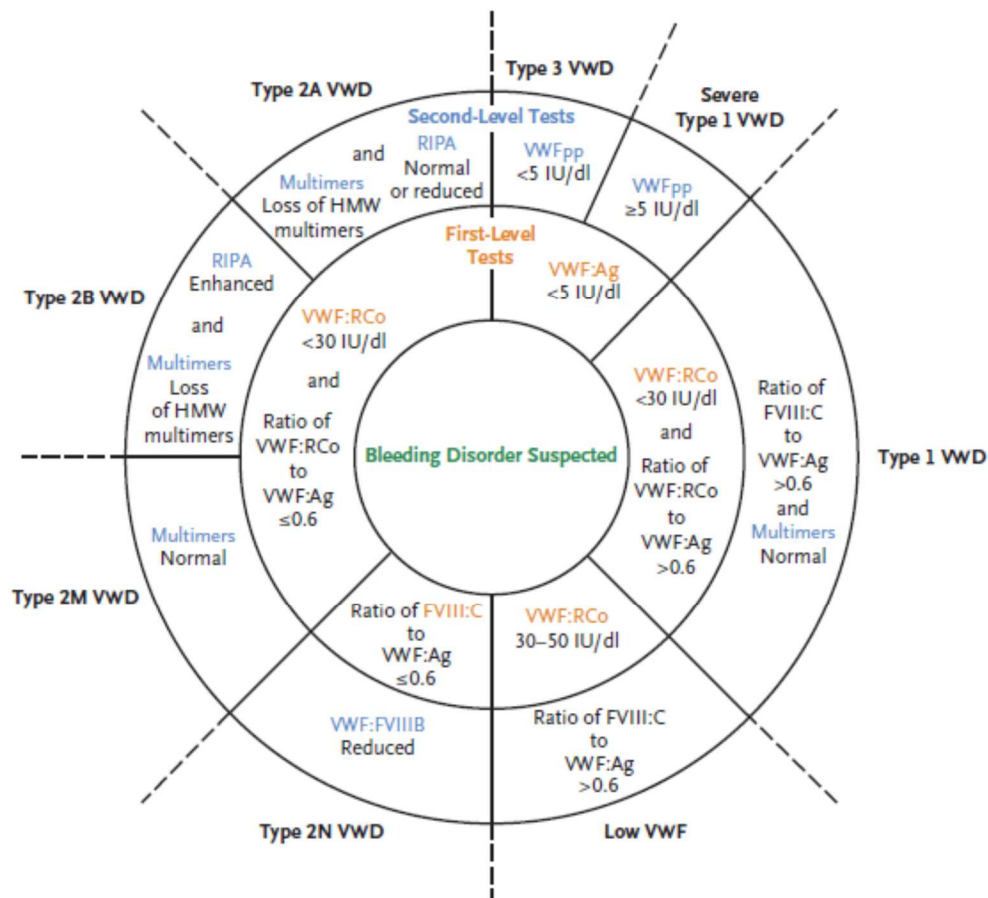


FIGURA 2: Algoritmo para el diagnóstico fenotípico de la EvW.
Frank W.G. Leebeek. Von Willebrand's Diseases. *N Engl J Med* 2016; 375:2067-80.

Catlab Informa

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA EvW:

El papel de la caracterización molecular en el diagnóstico de la EvW no es esencial si los pacientes han sido investigados exhaustivamente utilizando el análisis fenotípico. Por otro lado, si alguno de estos ensayos de fenotípicos no se dispone, la identificación de la mutación que causa la enfermedad podría ser crucial para un diagnóstico exacto. Sin embargo, hay varias razones para realizar el análisis molecular en pacientes fenotípicamente bien caracterizados; por ejemplo, en pacientes y sus familias cuando se necesita un diagnóstico prenatal (EvW tipo3 o tipo 2 grave).

Técnicas usadas en la caracterización molecular de pacientes con enfermedad de von Willebrand

Uso de ADN genómico en comparación con ARNm

Generalmente, la búsqueda de una mutación se realiza usando ADN genómico, ya sea a través de amplificación de los exones del FvW mediante un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguido de secuenciación con el método Sanger o, más recientemente, secuenciación de ADN de nueva generación (NGS).

También puede utilizarse el ARN mensajero (ARNm) aislado de las plaquetas del paciente. No obstante, la inestabilidad de estas últimas muestras y las técnicas más laboriosas necesarias para obtenerlas a menudo reducen el uso del análisis del ARNm. Esta estrategia generalmente se aplica para evaluar posibles mutaciones de corte y empalme o mutaciones intrónicas identificadas en potenciales áreas de regulación. El estudio del ARNm puede realizarse en pacientes con EvW cuando previamente no se identificaron mutaciones después de la evaluación a nivel exónico del ADN. Este método es razonable en pacientes con EvW tipos 3 o 2 (con historial familiar comprobado de hemorragias), pero no en casos de EvW tipo1 en los que las mutaciones no siempre se identifican.

Análisis directo de secuencias de ADN (método Sanger)

El método Sanger permite establecer la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN (análisis directo de secuencias de ADN). Esta técnica es la más frecuentemente adoptada para la identificación de mutaciones del FvW. La secuenciación directa está disponible en muchos laboratorios y está particularmente indicada para la identificación de la mutación genética en las variantes de la EvW tipo 2. No obstante, la secuenciación con el método Sanger no permite identificar grandes deleciones o duplicaciones heterocigotas. Esto ha dificultado la caracterización molecular de pacientes con EvW tipos 1 y 3

Análisis secuencial de nueva generación (NGS)

La NGS permite la investigación de toda la región codificante del FvW en poco tiempo y, por ende, este método es más adecuado para la investigación de las variantes de la EvW tipos 1 y 3. El estudio de las variantes del tipo 2 también puede realizarse usando esta técnica. No obstante, las muestras de ADN de los pacientes deberían enviarse a laboratorios genéticos que ya cuenten con experiencia en el uso de esta técnica a fin de controlar el costo del ensayo. **Amplificación**

de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA)

En el gen del FvW pueden estar presentes grandes deleciones y, más raramente, grandes duplicaciones. Si una deleción afecta solamente a un alelo, las técnicas basadas en la PCR no logran identificar la mutación. El método semicuantitativo de la técnica MLPA (MRC-Holland, Países Bajos) puede identificar grandes deleciones o duplicaciones de genes aun cuando estos defectos sean heterocigotos. La mayoría de las grandes deleciones se han identificado en pacientes con EvW tipo 3; no obstante, también se han identificado dentro del marco de lectura en casos de EvW tipos 1 y 2. Esta técnica, que puede adoptarse en todos los laboratorios que utilizan el método Sanger.

Catlab Informa

Bases de datos en línea sobre FvW

Una base de datos en línea sobre el gen del FvW está disponible a través del ISTH en la página Internet de la Universidad de Sheffield (<http://www.vwf.group.shef.ac.uk/>).

El listado de la mutación del FvW está en el portal de Bases de datos sobre variantes de factor de coagulación, de la Asociación Europea para la Hemofilia y Trastornos Afines (EAHAD) https://grenada.lumc.nl/LOVD2/VWF/home.php?select_db=VWF.

Se puede contribuir a estas bases de datos sobre EvW enviando las nuevas mutaciones identificadas junto con información sobre el fenotipo del paciente a la siguiente dirección: <https://grenada.lumc.nl/LOVD2/VWF/submit.php> ó <http://www.eahad-db.org/index.php>.

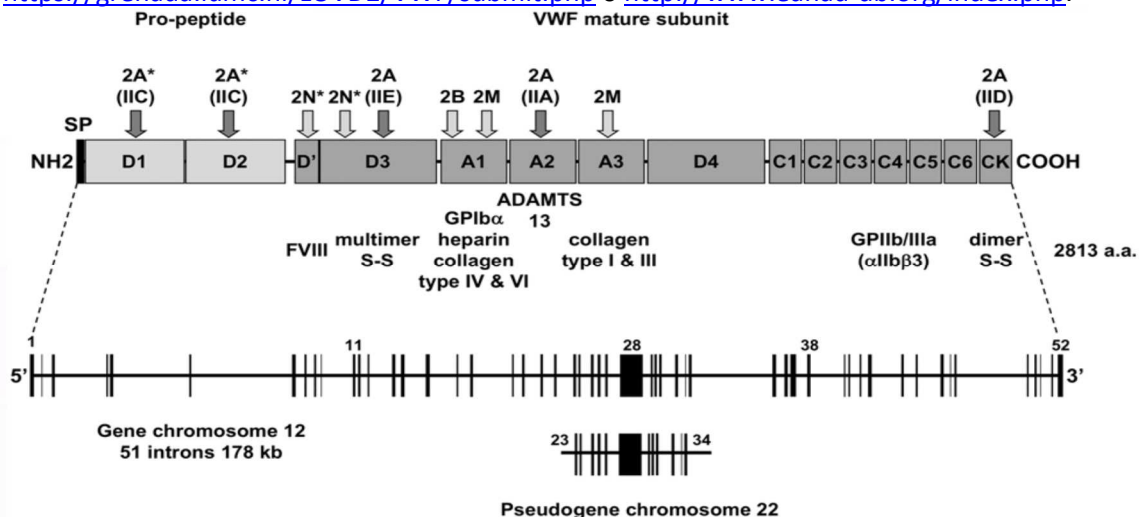


FIGURA 3. Estructura del precursor del FvW, su gen y pseudogen.
Baronciari L. Molecular diagnosis of von Willebrand disease. *Haemophilia* 2017; 23(2):188-197.

Como se menciona anteriormente, el papel de la caracterización molecular en el diagnóstico de la EvW no es indispensable si los pacientes han sido ampliamente investigados mediante el análisis de fenotipo. A continuación describimos la estrategia que puede utilizarse a fin de identificar las mutaciones en los pacientes que han sido totalmente caracterizados mediante los ensayos de fenotipo.

Caracterización molecular de pacientes con EvW tipos 1 y 3

El método para investigar las mutaciones genéticas causantes de los tipos 1 y 3 es similar dado que en comparación con el tipo 2, en el que la gran mayoría de las mutaciones se ubica en el exón 28 (véase la Figura 3), no existe una zona particular donde se hayan identificado las mutaciones. Debería investigarse toda la región codificante del FvW junto con las regiones intrónicas que la flanquean, las regiones 5' y 3' no traducidas y el promotor proximal del FvW. Asimismo, la identificación de mutaciones en pacientes con EvW tipo 3 es posible en casi todos los casos, mientras que en la EvW tipo 1 no se identifican las mutaciones en cerca del 30% de los pacientes investigados (principalmente en aquellos en los que el nivel de FvW:Ag es mayor a 30 IU/dL).

Diagnóstico prenatal (DPN) de la EvW tipo 3

En comparación con la hemofilia, la mayoría de los pacientes con EvW presentan síntomas hemorrágicos relativamente leves. Por lo tanto, el DPN generalmente no es necesario, excepto para los casos ocasionales de tipo 2, y de familias con EvW tipo 3 con un historial clínico grave. El DPN se requiere principalmente en casos en los que ambos padres ya saben que son portadores del tipo 3 de la EvW, con defectos genéticos identificados en su primer hijo afectado con síntomas hemorrágicos graves. Para las mutaciones conocidas, el análisis secuencial es el método predilecto; mientras que si no se conocieran las mutaciones genéticas pueden usarse los métodos NGS y, en caso necesario, MLPA.

Catlab Informa

Caracterización molecular de pacientes con EvW tipo 2

La caracterización de las mutaciones de la EvW tipo 2 no requiere el estudio de todo el gen del FvW, sino solamente la valoración del exón que codifica el dominio funcional específico identificado usando el método fenotípico. Esta estrategia puede aplicarse a todas las variantes del tipo 2 de la EvW (2A, 2B, 2M y 2N), si bien la valoración del tipo 2A puede resultar más compleja debido a la participación de diferentes dominios funcionales implicados en el fenotipo de estos pacientes (véase la Figura 3). En la **EvW tipo 2B**, que tiene un patrón de herencia autosómico dominante, solo se espera una mutación. Estas mutaciones se encuentran en el dominio A1, y están relacionadas con la unión espontánea del FvW al receptor plaquetario GPIIb/IIIa (RIPA <0.7 mg/ml), y puede utilizarse un análisis de PCR simple, seguido de un análisis secuencial. Si no se identificara mutación alguna en el dominio A1 del FvW, a pesar de un claro aumento del ensayo RIPA obtenido del plasma rico en plaquetas del paciente, será necesario el análisis de secuenciación directa del *GP1BA* para descartar la pseudo-EvW, también conocida como EvW tipo plaquetario. La **EvW tipo 2M** también tiene un patrón de herencia autosómico dominante. Las mutaciones de cambio de sentido se localizan más comúnmente en el dominio A1. Estos defectos están relacionados con una disminución de la capacidad del FvW para unirse al receptor GPIIb/IIIa (FvW:RCo/FvW:Ag <0.6). No obstante, en la EvW tipo 2M también se observan defectos de unión al colágeno (FvW:CB/FvW:Ag <0.6). En este caso, la mayoría de las mutaciones se ubica en el dominio A3. La **EvW tipo 2N** tiene un patrón de herencia autosómico recesivo, por lo que es de esperarse que ambos alelos presenten mutaciones (ya sean heterocigotas compuestas u homocigotas). Las mutaciones homocigotas pueden encontrarse en pacientes nacidos de relaciones consanguíneas, pero también en poblaciones europeas debido a la elevada prevalencia de la mutación p.Arg854Gln, que con frecuencia se presenta en forma homocigota. Las mutaciones heterocigotas compuestas generalmente presentan una combinación de mutación tipo 2N con un defecto tipo 1 o 3 en el FvW. Los pacientes con **EvW tipo 2A** presentan un grupo heterogéneo de mutaciones ubicadas en diferentes dominios funcionales del FvW. Todas estas mutaciones afectan en diferente medida el tamaño del multímero del FvW, por lo que estos pacientes presentan una pérdida variable de MAPM. La forma más común de EvW tipo 2A tiene un patrón de herencia autosómico dominante y las variantes se ubican en el dominio A2, en el que se encuentra el sitio de escisión para ADAMTS13. Estas variantes se caracterizan por la pérdida de multímeros de tamaños grande y mediano, relacionada con el aumento de bandas de tripletes debido a una mayor susceptibilidad a la acción proteolítica de ADAMTS13. La segunda forma más común del tipo 2A de la EvW tiene un patrón de herencia autosómico dominante, y las variantes se ubican en el dominio D3, el cual desempeña un papel importante en la multimerización del FvW. Estas variantes se caracterizan por una modesta pérdida de multímeros de APM, relacionada con la ausencia de bandas de tripletes satélites debido a una menor susceptibilidad a la acción proteolítica de ADAMTS13. Una forma poco común de la EvW tipo 2A que también tiene un patrón de herencia autosómico dominante, se debe a variantes ubicadas en el dominio CK, que desempeña un papel importante en la dimerización del FvW. Se caracterizan por la pérdida de multímeros de APM, relacionada con la presencia de bandas de tamaños "impares" en el análisis de multímeros de resolución intermedia. Una forma todavía menos común de la EvW tipo 2A, que tiene un patrón de herencia autosómico recesivo, se debe a variantes ubicadas en los dominios D1-D2 (propeptidos) que desempeñan un papel importante en la multimerización del FvW. Las mutaciones de los pacientes pueden ser homocigotas en los dominios D1 o D2, o heterocigotas compuestas con un segundo defecto en alguna otra parte del FvW. Estas variantes se caracterizan por la pérdida de multímeros de tamaños grande y mediano, relacionada con la ausencia de bandas de tripletes satélites debida a una menor susceptibilidad a la acción proteolítica de ADAMTS13.

Catlab Informa

ESTUDIO EN CATLAB

Los estudios de coagulación especial, que incluyen los factores de coagulación, se realizan los miércoles de cada semana (excepto en Agosto), previa programación del paciente en uno de los puntos de extracción que corresponda por zona: Hospital Universitari Mutua de Terrassa, Hospital Consorci Sanitari de Terrassa, ó Fundació Hospital Sant Joan de Deu de Martorell. Esto es para asegurar el correcto manejo preanalítico de las muestras: extracción, transporte y tiempo transcurrido antes del procesamiento. Si se requiriera una determinación urgente por necesidad del paciente, se tendría que contactar con los Hematólogos del laboratorio.

Estas pruebas se deben solicitar en pacientes con antecedentes familiares, con manifestaciones hemorrágicas, o con alteración de pruebas básicas de coagulación. Es importante que se investigue la historia personal o familiar de sangrado y se utilice alguna de las escalas de riesgo existentes. Se debe descartar además que el paciente reciba antiagregantes, anticoagulantes u otros fármacos que puedan alterar los resultados.

Nuestro laboratorio realiza las pruebas básicas de coagulación y las pruebas de primer nivel para el diagnóstico de la EvW: FVIII por método coagulométrico, FvW:Ag mediante inmunoensayo automatizado con micropartículas de látex (LIA) y FvW:RCo mediante inmunoturbidimetría amplificada con partículas de látex unidas al GPIIb α por medio de un anticuerpo monoclonal. Los resultados se expresan en %, que por la calibración de la técnica utilizada, son equivalentes a UI/dL. El PFA100[®] se envía directamente de los centros extractores a un laboratorio de referencia. Si se quisiese realizar pruebas diagnósticas de segundo nivel o moleculares para el diagnóstico de la EvW, se deberá derivar al paciente a la consulta especializada de Hematología/Coagulación de los centros antes mencionados, para que a través de ellos y en coordinación con los hematólogos del laboratorio, se envíen las muestras a un centro de referencia especializado.

ELABORADO POR:

Jorge Medina

Facultativo del área de Hematología CATLAB. jmedina@catlab.cat

Miquel Diaz

Facultativo del área de Hematología CATLAB. mdiaz@catlab.cat / mdiaz@mutuaterrassa.cat

Teresa Villalba

Facultativo del área de Hematología CATLAB. tvillalba@catlab.cat

CATLAB / Área de Hematología

Tel. 93.748.56.00 - ext. 35038 - 35037

www.catlab.cat

BIBLIOGRAFIA:

1. Frank W.G. Leebeek. Von Willebrand's Disease. *N Engl J Med* 2016; 375:2067-80.
2. Francesca Stufano. Diagnóstico de la enfermedad de Von Willebrand. Caracterización fenotípica. *FMH. Tratamiento de la Hemofilia* 2017; 55
3. Baronciani L. Molecular diagnosis of von Willebrand disease. *Haemophilia* 2017; 23(2):188-197.
4. Sarah H. O'Brien. Bleeding scores: are they really useful? American Society of Haematology, the educational program 2012.

Catlab Informa

ANEXO 1

Condensed version of the bleeding assessment tool.

Epistaxis		Oral cavity		Surgery		Muscle hematoma	
0	No or trivial (less than 5)	0	No	-1	No bleeding in at least 2 surgeries	0	Never
1	> 5 or more than 10'	1	Reported at least one	0	Not done or no bleeding in 1 surgery	1	Post-trauma no therapy
2	CONSULTATION ONLY	2	CONSULTATION ONLY	1	Reported in <25% of all surgeries	2	Spontaneous no therapy
3	Packing or Cauterization or Antifibrinolytics	3	Surgical hemostasis or Antifibrinolytics	2	Reported in >25% of all surgeries, no intervention	3	Spontaneous or traumatic requiring Desmopressin or Replacement therapy
4	Blood transfusion or Replacement therapy or Desmopressin	4	Blood transfusion or Replacement therapy or Desmopressin	3	Surgical hemostasis or Antifibrinolytics	4	Spontaneous or traumatic requiring Surgical intervention or Blood transf
4	Blood transfusion or Replacement therapy or Desmopressin	4	Blood transfusion or Replacement therapy or Desmopressin	4	Blood transfusion or Replacement therapy or Desmopressin	4	Spontaneous or traumatic requiring Surgical intervention or Blood transf

Cutaneous		GI bleeding		Menorrhagia		Hemarthrosis	
0	No or trivial (<1 cm)	0	No	0	No	0	Never
1	>1 cm and no trauma	1	Associated with ulcer, portal hypertension, hemorrhoids, angiodysplasia	1	CONSULTATION ONLY	1	Post-trauma no therapy
2	CONSULTATION ONLY	2	Spontaneous	2	Antifibrinolytics or pill use	2	Spontaneous no therapy
		3	Surgical hemostasis or Blood transfusion or Replacement therapy or Desmopressin or Antifibrinolytics	3	Curettage or Iron therapy	3	Spontaneous or traumatic requiring desmopressin or Replacement therapy
		4	Blood transfusion or Replacement therapy or Desmopressin or Antifibrinolytics	4	Blood transfusion or Replacement therapy or Desmopressin or Hysterectomy	4	Spontaneous or traumatic requiring surgical intervention or blood transfusion

Bleeding from minor wounds		Tooth extraction		Post-partum hemorrhage		CNS bleeding	
0	No or trivial (less than 5)	-1	No bleeding in at least 2 extractions	-1	No bleeding in at least 2 deliveries	0	Never
1	> 5 or more than 5'	0	Not done or no bleeding in 1 extraction	0	No deliveries or no bleeding in 1 delivery	1	-
2	CONSULTATION ONLY	1	Reported in <25% of all procedures	1	CONSULTATION ONLY	2	-
3	Surgical hemostasis	2	Reported in >25% of all procedures, no intervention	2	Curettage or Iron therapy or Antifibrinolytics	3	Subdural, any intervention
4	Blood transfusion or Replacement therapy or Desmopressin	3	Resuturing or Packing	3	Blood transfusion or Replacement therapy or Desmopressin	4	Intracerebral, any intervention
		4	Blood transfusion or Replacement therapy or Desmopressin	4	Hysterectomy		

Total assigned score:

Catlab Informa

ANEXO 2

Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 (MCMDM-1) VWD - Scoring sheet

Symptom	SCORE					
	-1	0	1	2	3	4
Epistaxis	-	No or trivial (less than 5)	> 5 or more than 10'	Consultation only	Packing or Cauterization or Antifibrinolytic	Blood transf or Replacement therapy or Desmopressin
Cutaneous	-	No or trivial (<1 cm)	> 1 cm and no trauma	Consultation only		
Bleeding minor wounds	-	No or trivial (less than 5)	> 5 or more than 5'	Consultation only	Surgical hemostasis	Blood transf or Replacement therapy or Desmopressin
Oral cavity	-	No	Referred at least one	Consultation only	Surgical hemostasis or Antifibrinolytic	Blood transf or Replacement therapy or Desmopressin
GI bleeding	-	No	Associated with ulcer, portal hyp., hemorrhoids, angiodysplasia	Spontaneous	Surgical hemostasis, Blood transf, Replacement therapy, Desmopressin, Antifibrinolytic	
Tooth extraction	No bleeding in at least 2 extraction	None done or no bleed. in 1 extraction	Referred in <25% of all procedures	Referred in >25% of all procedures, no intervention	Resuturing or packing	Blood transf or Replacement therapy or Desmopressin
Surgery	No bleeding in at least two surgeries	None done or no bleed. in 1 surgery	Referred in <25% of all surgeries	Referred in >25% of all procedures, no intervention	Surgical hemostasis or Antifibrinolytic	Blood transf or Replacement therapy or Desmopressin
Menorrhagia	-	No	Consultation only	Antifibrinolytics, Pill use	D & C, Iron therapy	Blood transf or Replacement therapy or Desmopressin or Hysterectomy
Post-partum hemorrhage	No bleeding in at least two deliveries	No deliveries or no bleeding in 1 delivery	Consultation only	D & C, Iron therapy, Antifibrinolytics	Blood transf or Replacement therapy or Desmopressin	Hysterectomy
Muscle hematomas	-	Never	Post trauma no therapy	Spontaneous, no therapy	Spontaneous or traumatic, requiring Desmopressin or Replacement therapy	Spontaneous or traumatic, requiring Surgical intervention or blood transfusion
Hemarthrosis	-	Never	Post trauma no therapy	Spontaneous, no therapy	Spontaneous or traumatic, requiring Desmopressin or Replacement therapy	Spontaneous or traumatic, requiring Surgical intervention or blood transfusion
CNS bleeding	-	Never	-	-	Subdural, any intervention	Intracerebral, any intervention