

Avanços diagnósticos na Doença de von Willebrand

Discente: Juliana Eiko Outida

Academia de Ciência e Tecnologia - AC&T, São José do Rio Preto - SP

Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum, Prof. Dr. Flávio Augusto Naoum

Dezembro de 2022

Resumo: A doença de von Willebrand envolve diferentes graus de distúrbio coagulatório, com prejuízo à hemostasia e com possibilidade aumentada do desencadeamento de eventos hemorrágicos importantes. Para oferecer tratamento adequado, se faz necessário um diagnóstico preciso, o qual envolve a apresentação clínica e a confirmação laboratorial. Desde as pioneiras técnicas laboratoriais de dosagem do fator de von Willebrand via ensaios imunoenzimáticos, houve significativos avanços tanto na sensibilidade quanto nos fundamentos da investigação laboratorial. Este manuscrito foi elaborado como revisão bibliográfica dos principais avanços diagnósticos nas últimas décadas. Há destaque nos ensaios qualitativos, em particular à evolução na caracterização da interação do fator de von Willebrand com plaquetas. Esses marcos laboratoriais permitiram significativo aumento na sensibilidade e especificidade diagnóstica, permitindo a identificação dos subtipos da doença e, progressivamente, levam a patamares cada vez mais eficientes de tratamento e melhora na qualidade de vida dos pacientes acometidos.

1. Introdução

A doença de von Willebrand (DVW) é o distúrbio de coagulação autossômico mais prevalente, chegando a afetar uma taxa estimada de 1 para cada 10.000 indivíduos, causando significativa perda de qualidade de vida. ¹ A DVW autossômica atinge igualmente ambos os sexos, enquanto a DVW adquirida é mais predominante em pacientes submetidos a certos procedimentos agressivos ao

tecido sanguíneo, tais como oxigenação por membrana extracorpórea e válvulas cardíacas metálicas.² Foi inicialmente descrita em 1926 pelo médico finlandês Erik von Willebrand, quando identificou uma família de alto grau de consanguinidade com grave distúrbio coagulatório.³ A fisiopatologia da DVW se dá centralmente a alterações no complexo quaternário formado por subunidades de glicoproteínas, o chamado fator de von Willebrand (FVW). O FVW é um complexo proteico plaquetário e plasmático produzido no tecido endotelial, megacariócitos e plaquetas. Possui várias funções importantes no processo de hemostasia, sendo as principais a proteção à degradação do fator VIII da via intrínseca de coagulação, o provimento de sítio de ligação do fator VIII ao tecido lesionado e substrato para uma rede de agregação de plaquetas e formação do plugue plaquetário. Esse sistema culmina com contribuição na formação de fibrina, promovendo a hemostasia e permitindo o processo de reparo tecidual.

Os sinais e sintomas mais frequentes da DVW envolvem sangramento mucocutâneo aumentado ou excessivo que podem se manifestar como sangramento nasal e oral, susceptibilidade a equimoses, aumento do tempo de coagulação em ferimentos, aumento do fluxo menstrual e até hematomas musculares.⁴ Para a avaliação clínica padronizada e maior acurácia diagnóstica, diferentes algoritmos foram propostos. No entanto, apesar de a hipótese diagnóstica inicial se basear essencialmente no histórico da doença, histórico familiar e apresentação clínica, todos os algoritmos se fundamentam no fato de que a confirmação se dará com a avaliação laboratorial especializada. A investigação clínica se dá com questionários padronizados que exploram objetivamente os sintomas hemorrágicos (menorragia, sangramento cutâneo, sangramento gengival etc.) e proveem um escore numérico que servirá para o diagnóstico e classificação da doença. Dentre os questionários mais utilizados e estudados, destaca-se o formulado pela ISTH¹,

¹ Disponível em https://www.isth.org/page/reference_tools

que orienta que sejam testados laboratorialmente as crianças, homens e mulheres com escore maior ou igual a 3, 4 e 6, respectivamente. No entanto, tais questionários podem gerar um resultado negativo em uma parcela de pacientes que ainda não passaram por eventos hemostáticos importantes, ainda mais em se tratando da variação dos parâmetros de normalidade entre indivíduos em relação a sangramento de origem menstrual aumentado.⁵

De acordo com os critérios desenvolvidos pelas instituições americanas Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia (ISTH), o Instituto Nacional de Saúde (NIH) e o Instituto Nacional do Coração, Pulmão e Sangue (NHLBI), a classificação da DVW se dá em três grandes categorias:

- Tipo 1: deficiência quantitativa parcial do FVW (mais comum, 85% dos casos);
- Tipo 2: deficiência qualitativa do FVW;
- Tipo 3: deficiência quantitativa completa de FVW

Por sua vez, o tipo 2, é subcategorizado para melhor especificar qual é o tipo de deficiência que envolve o FVW. O tipo 2A refere-se a defeitos na etapa de multimerização; o tipo 2B apresenta um aumento no fator de ligação às plaquetas; no tipo 2M há defeitos na ligação às plaquetas ou ao colágeno; finalmente, o tipo 2N descreve defeitos na interação do FVW com o fator VIII.^{6,7}

Nesta etapa, o profissional hematologista pode contar com vários tipos de ensaios para a identificação da DVW, sendo os principais fundamentados em, além da mensuração do FVW via ensaio imunoenzimático (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA*), a dosagem do fator VIII e do grau de atividade de ligação FVW-plaqueta.^{6,8} Frente a dificuldade diagnóstica dos subtipos da doença, testes adicionais podem ser considerados, são eles: multímeros do FVW, fator pró-peptídeo VW, e atividade de ligação do FVW com colágeno.

Nos últimos anos a literatura trouxe novidades diagnósticas interessantes nos ensaios de atividade de ligação plaquetária com o FVW, e por isso, serão os objetos de estudo deste manuscrito.

2. Objetivo

O objetivo deste manuscrito é de prover revisão bibliográfica focando nos avanços mais recentes do diagnóstico laboratorial da doença de von Willebrand (DVW), dando ênfase nos novos testes de atividade de ligação plaquetária com o FVW. Este trabalho é orientado à ótica do biomédico hematologista e ao seu papel fundamental no processo de confirmação laboratorial perante a hipótese clínica e histórico familiar da doença.

3. Materiais e Métodos

Por se tratar de uma revisão bibliográfica, a metodologia deste artigo se baseou na busca bibliográfica indexada no banco de dados Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), com o uso do termo MeSH (*Medical Subject Headings*) “*von willebrand*”, adicionado dos modificadores “*antigen*”, “*update*”, “*diagnosis*”, “*epidemiology*”. Os resultados foram filtrados de acordo com data e citações, sendo os artigos mais recentes priorizados, bem como aqueles com maior número de citações e pertencentes a revistas de maior fator de impacto.

4. Discussão

4.1. Estrutura do FVW e o estresse de cisalhamento

Para melhor entender o papel do FVW na hemostasia, é fundamental conhecer sua estrutura e suas relações com os demais componentes sanguíneos. O FVW é um polímero com repetição variável de monômeros (multímero), podendo variar de tamanho entre 500 a 20.000 kDa, sendo os maiores, os mais efetivos do ponto de vista da hemostasia.⁹ Cada monômero é constituído de vários domínios, os quais iremos destacar para o escopo deste manuscrito apenas os domínios chamados de A1, A2 e A3, responsáveis pela ligação a plaquetas e a componentes da matriz subendotelial, como os diferentes tipos de colágeno.¹⁰ Sob condições fisiológicas, a estrutura nativa do FVW assume um aspecto colapsado globular (Fig. 1a) e apresenta grande afinidade de ligação com o fator VIII. No entanto, essa configuração tende a interiorizar os domínios A1-A3, causando baixa exposição à superfície do múltímero e, portanto, baixa afinidade de ligação com plaquetas e colágeno.¹¹

A lesão tecidual, por sua vez, ativa o mecanismo inflamatório, que envolve, entre outros mecanismos, a vasoconstrição na periferia imediata da injúria. Com a diminuição do calibre capilar, há o aumento das forças hidrodinâmicas e turbilhonamento sanguíneo, o que causa o estiramento da forma globular do FVW, o qual vai assumindo uma conformação cada vez mais alongada, podendo chegar à ordem de vários micrômetros (Fig. 1b).^{10,12} Esse processo exterioriza e modula os domínios de ligação ao colágeno e ao receptor plaquetário GPIIb/IIIa, permitindo a interação entre o FVW e esses componentes. Conforme múltímeros do FVW vão sendo alongados e assumindo sua conformação ativa, mais e mais plaquetas vão aderindo ao local, permitindo a formação de uma rede interconectada e, conseqüentemente o plugue plaquetário (trombo branco)

(Fig. 1c). Uma vez formado, o trombo branco diminui o fluxo sanguíneo local, bloqueando a hemorragia e ativando o processo de regeneração tecidual.

Toda essa dinâmica de ativação do FVW de acordo com condições específicas de lesão vascular é extremamente interessante. É um mecanismo que, ao mesmo tempo em que é ativado apenas na necessidade de cessação de hemorragia, também permanece inativo sob condições normais de circulação sanguínea, prevenindo a formação de oclusões trombóticas em tecidos e órgãos, evitando complicações graves como isquemia renal, infarto do miocárdio e acidente vascular encefálico.

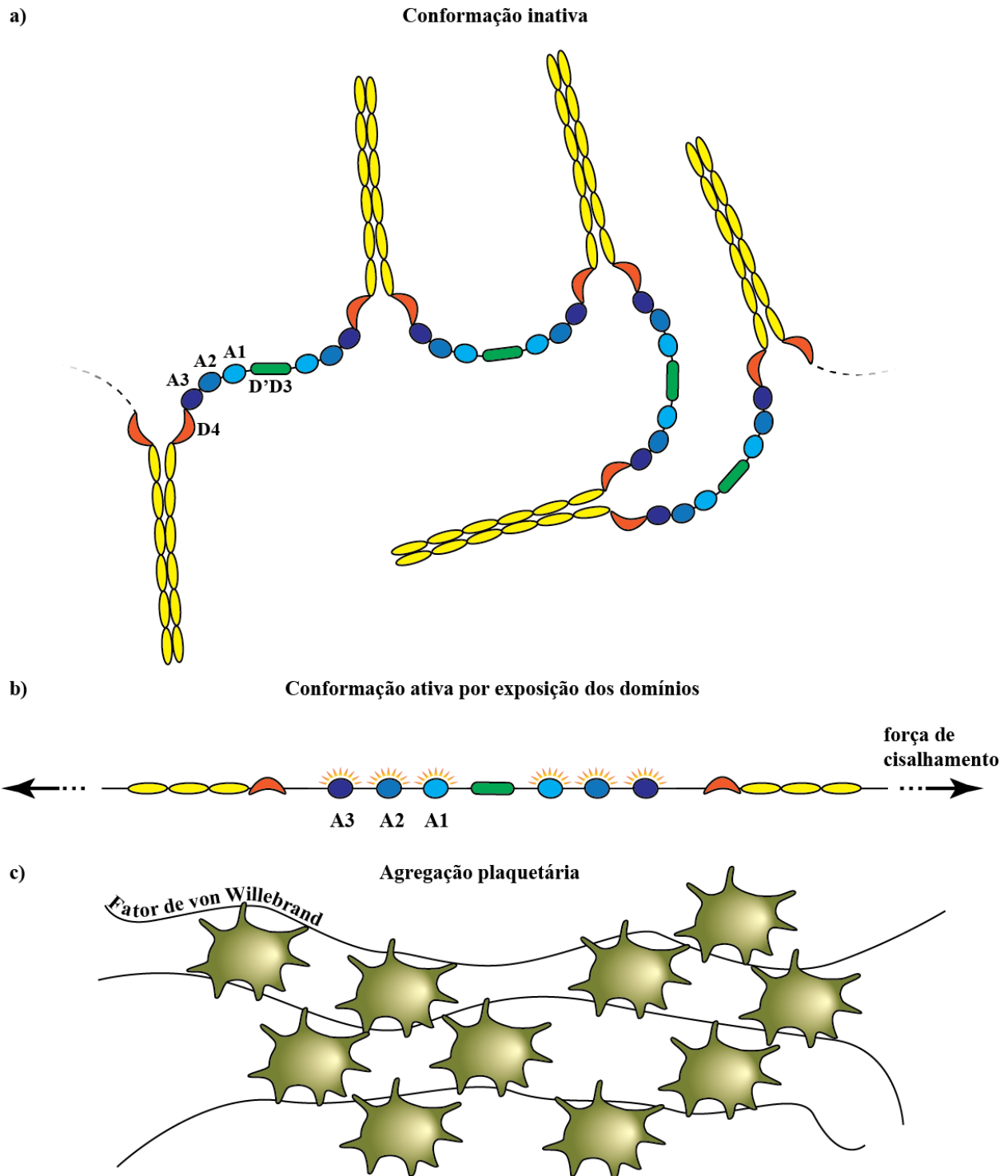


Figura 1. Esquema simplificado da estrutura proteica do FVW. **a)** Fragmento da cadeia polimérica do FVW como repetição variável das mesmas unidades monoméricas. Sob condições fisiológicas de fluxo sanguíneo, a cadeia assume esta forma globular. **b)** Após lesão tecidual e vasoconstrição,

agora sob condições de estresse hidrodinâmico das forças de cisalhamento aumentadas, todo o complexo é estirado, causando a exposição e ativação dos domínios funcionais. c) Com a ativação dos domínios, plaquetas que chegam ao local da lesão vão se ligando a várias unidades do FVW, dando origem a uma rede de agregação plaquetária e, posteriormente, o plugue plaquetário. Adaptado de Zhou *et al.* (2012)¹³ e Lof *et al.* (2017).¹⁰

4.2. DVW e o laboratório

Exames laboratoriais de rotina podem identificar distúrbios coagulatórios de forma mais grosseira, sendo que no caso da DVW, a contagem de plaquetas tende a ser normal, tempo de protrombina inalterado, e tempo de tromboplastina parcial ativada prolongado (maior *turnover* do fator VIII). Exames específicos para a detecção da DVW se dá por dois tipos principais de análise: quantitativa e qualitativa, descritos a seguir.

4.3. FVW:Ag

Por décadas, a quantificação do FVW plasmático em um paciente tem sido feita por dosagem do peptídeo FVW (**FVW:Ag**) via ELISA, e mais recentemente com automação com aglutinação em látex. Apesar de a metodologia ELISA ser bastante robusta, se trata de um método relativamente lento e passível de interferência e falsos positivos na presença de fator reumatoide.

¹⁴ Portanto, é estabelecido que a avaliação quantitativa também deve ser complementada por

investigação qualitativa dos diferentes graus de atividade funcional, pela ligação plaquetária, ligação com o colágeno e dosagem de fator VIII para melhorar a sensibilidade do diagnóstico.⁸

4.4. FVW:RCo

Classicamente, o teste padrão para avaliação de atividade de ligação plaquetária com o FVW tem sido baseado na aglutinação na atividade de cofator ristocetina (*ristocetin cofactor activity assay* - **FVW:RCo**).¹⁵ Este teste consiste na utilização da ristocetina como indutor de mudança conformacional da cadeia polipeptídica do FVW, permitindo a exposição do domínio A1, o qual ligar-se-á às plaquetas via receptor GPIb α , causando aglutinação.¹⁶ No entanto, vem se descobrindo que o FVW:RCo apresenta limitações importantes que podem restringir sua aplicação e valor como teste diagnóstico isolado. Ele apresenta alto coeficiente de variação intra e interlaboratoriais, além de baixa sensibilidade, dificultando sua aplicação em casos onde os níveis de FVW são menores que 20 UI/dL.¹⁷ Outra limitação se dá pelo polimorfismo do domínio A1, com o envolvimento de mutações que interferem na ligação da ristocetina, podendo gerar falso-positivos.¹⁸

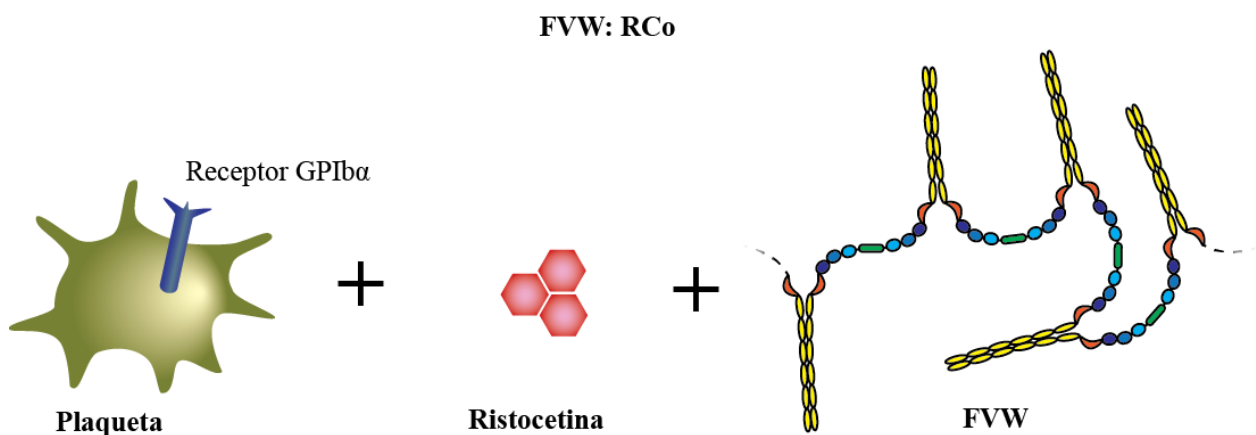


Figura 2. O ensaio FVW:RCo faz uso da ristocetina como indutor de mudança conformacional da cadeia polipeptídica do FVW, permitindo a exposição do domínio A1, o qual ligar-se-á às plaquetas via receptor GPIIb/IIIa, causando aglutinação. Adaptado de Fogarty *et al.* (2020)¹⁴ e Sharma & Haberichter (2019).⁴

Com o objetivo de minimizar tais problemas, foram sendo desenvolvidas novas técnicas que puderam eliminar o uso de plaquetas inteiras e então reduzir interações espúrias e gerar resultados imprecisos. Mais recentemente, vem se utilizando fragmentos recombinantes do receptor GPIIb/IIIa da plaqueta, os quais são ancorados em micropartículas inertes, caracterizando o ensaio chamado **FVW:GPIIbR**.^{17, 19} O resultado da eliminação da plaqueta inteira nessa técnica ocasiona menor variabilidade e maior sensibilidade, ficando livre inclusive das interferências das mutações do FVW que podem comprometer o teste FVW:RCo. O FVW:GPIIbR é comercialmente disponível via Europa e Canadá.¹⁷

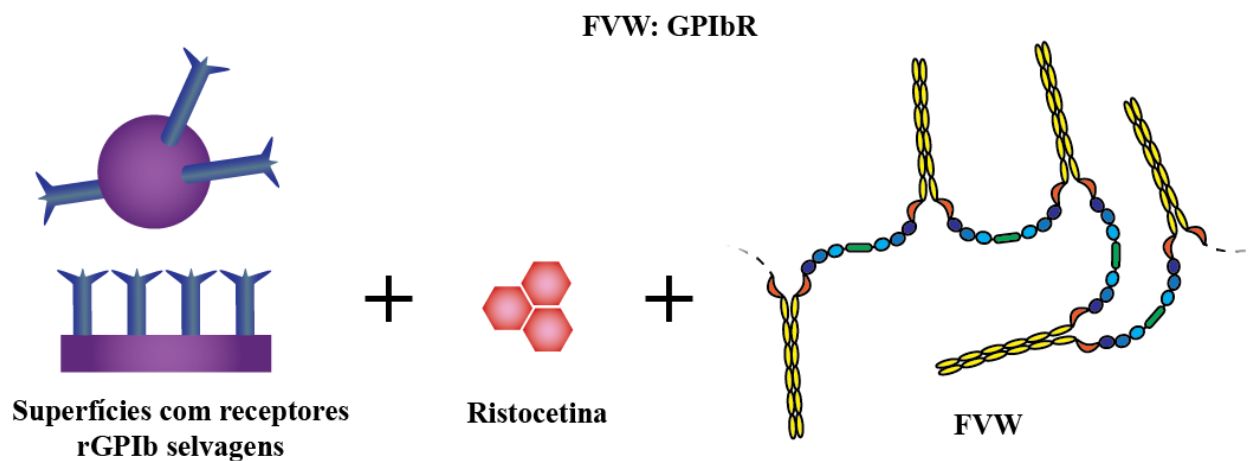


Figura 3. O ensaio FVW:GPIbR elimina a necessidade do uso de plaquetas, permitindo menor interferência de polimorfismos e maior sensibilidade. Adaptado de Fogarty *et al.* (2020)¹⁴ e Sharma & Haberichter (2019).⁴

Mais recentemente, o ensaio **FVW:GPIbM** vem trazendo importantes novidades. Aqui se faz uso de receptores GPIb α recombinantes e com ganho de função ancorados em partículas de látex ou em uma placa de ELISA, o que possibilita a ligação do FVW na ausência da ristocetina.^{20, 21} Tal eliminação da necessidade do uso de ristocetina no FVW:GPIbM representa um avanço expressivo, pois minimiza ainda mais a interferência de polimorfismos. A literatura relata que a técnica FVW:GPIbM apresenta superioridade em relação ao coeficiente de variação interlaboratorial, maior sensibilidade e em menores limites de concentração, e excelente correlação com os dados acumulados ao longo dos anos de uso do tradicional FVW:RCo.^{17, 22} Essa nova modalidade está disponível em plataforma automatizada no Canadá e Europa, enquanto uma versão baseada em teste imunoenzimático é encontrada nos EUA.

Recentemente Boender *et al.*²³ promoveram um estudo comparando estas três técnicas com uma coorte bem definida de pacientes com a doença de VW, chegando à conclusão que, de fato o tradicional FVW:RCo havia sido superado em termos de precisão, sensibilidade e acurácia diagnóstica pelo FVW:GPIbR e FVW:GPIbM.

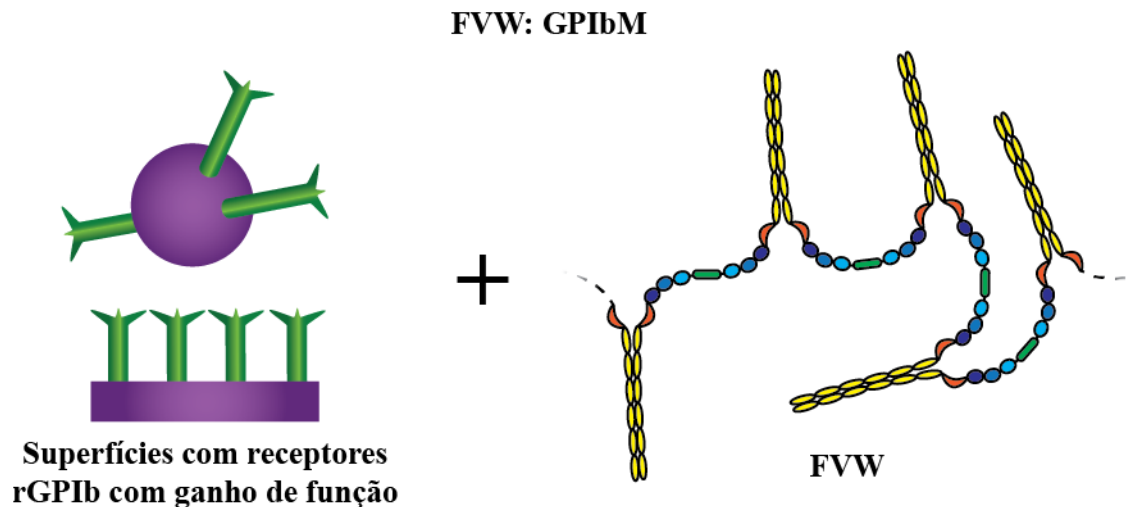


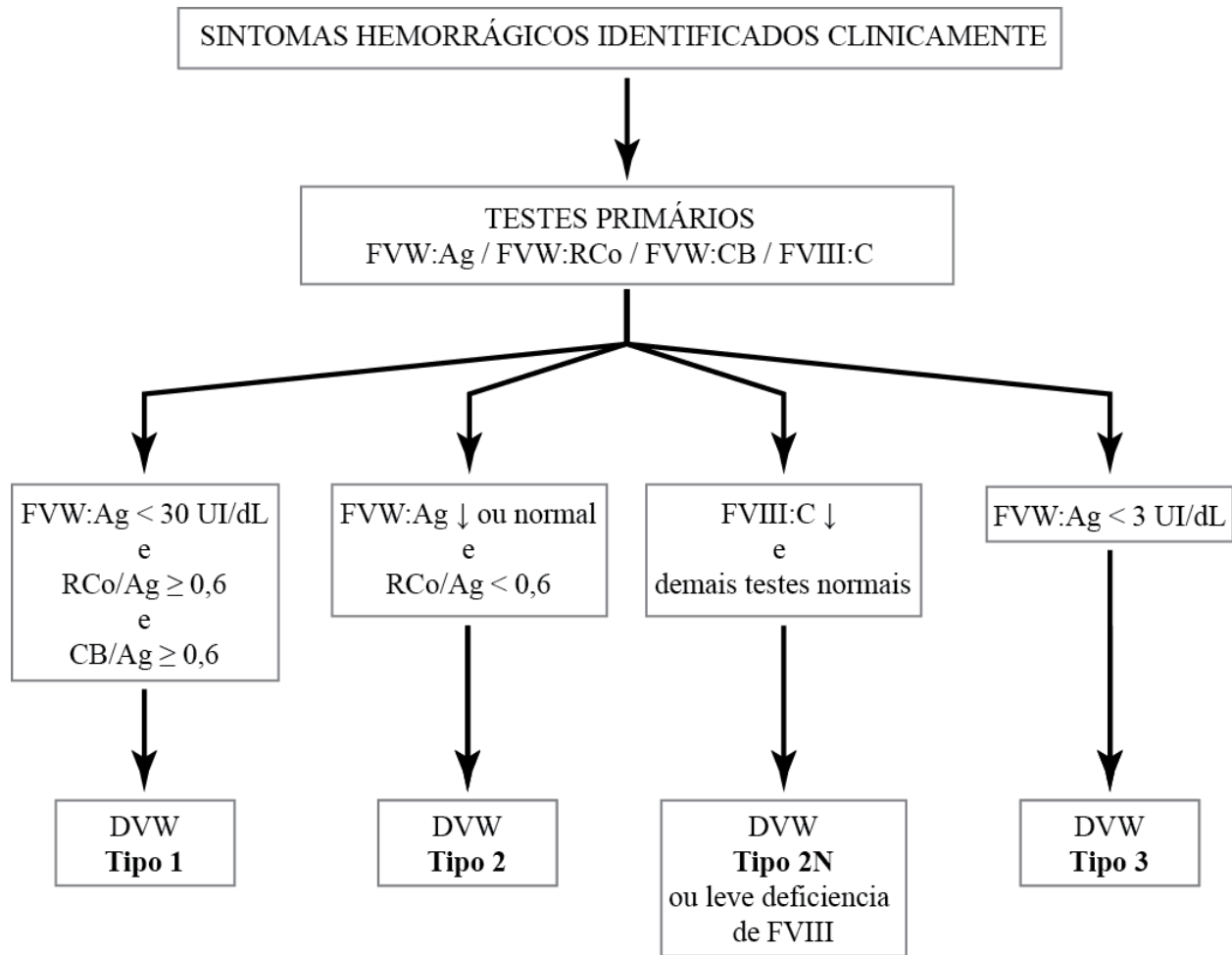
Figura 4. O ensaio FVW:GPIbM elimina a necessidade do uso da ristocetina, e por isso minimiza ainda mais a interferência de polimorfismos, apresenta superior coeficiente de variação interlaboratorial e maior sensibilidade. Adaptado de Fogarty *et al.* (2020)¹⁴ e Sharma & Haberichter (2019).⁴

Somando às opções que o biomédico dispõe para avaliação qualitativa da DVW, existe a possibilidade da caracterização da interação do FVW com colágeno, o chamado FVW:CB (*collagen-binding*). Parte importante da fisiologia do processo de hemostasia se dá pela capacidade do FVW ligar-se ao colágeno subendotelial exposto no local da lesão e mediar o recrutamento plaquetário. Saelman *et al.* descrevem que o domínio A3 do FVW tem a capacidade de se ligar ao colágeno I e III, enquanto o domínio A1 se liga ao colágeno IV e VI.²⁴ Por isso, os testes de ligação do FVW com o colágeno tipicamente envolvem o uso dos tipos I e/ou III e são bastante sensíveis mesmo a baixos níveis dos multímeros de FVW.²⁵ Ademais, os testes tipo FVW:CB são capazes de identificar até mesmo certas mutações envolvendo o domínio A3 do FVW em pacientes

que geralmente demonstram fenótipo da DVW, porém não são identificáveis via métodos mais tradicionais, como o FVW:RCo.¹⁴

É importante ressaltar o fato que, apesar de dispormos de várias modalidades de testagem para o diagnóstico laboratorial da DVW, nossos resultados ainda são sujeitos a fatores limitantes e de interferência. Como os principais fatores de interferência identificados nos testes quantitativos e qualitativos, temos a variação fisiológica do FVW (de 50 a 200 IU/dL), o uso de anticoncepcionais, gravidez, respostas de fase aguda, e ciclo circadiano.^{26, 27}

Tendo descritos as principais modalidades de testes laboratoriais para a DVW, podemos sintetizar um algoritmo diagnóstico de acordo com os *guidelines* da United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation (UKHCDO), como descrito por Laffan *et al.*²⁸ na Figura 4.



- **Figura 5.** Algoritmo diagnóstico de acordo com os *guidelines* da United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation (UKHCDO), adaptado de Laffan *et al.* ²⁸

5. Conclusão

As últimas décadas trouxeram avanços importantes nas metodologias laboratoriais que confirmam e precisam o diagnóstico da DVW. Presenciamos a incorporação de técnicas qualitativas às pioneiras técnicas quantitativas. Dentre os ensaios qualitativos, destacamos a

interação do FVW com o colágeno da matriz extracelular e com receptores plaquetários. Essa última categoria, por sua vez, evoluiu substancialmente com a eliminação da necessidade do uso de plaquetas inteiras e do reagente ristocetina. Faz-se necessário ressaltar que, como toda tecnologia no estado da arte, ainda existem significativos obstáculos quanto a disponibilidade comercial e à viabilidade financeira, em especial em países em desenvolvimento. No entanto, a literatura vem mostrando evolução diligente, e o acompanhamento dela pode apresentar oportunidades de diferenciação na prestação de serviços diagnósticos ao biomédico.

6. Referências

1. Ng C, Motto DG, Di Paola J. Diagnostic approach to von Willebrand disease. *Blood*. 2015;125(13):2029-37 DOI: 10.1182/blood-2014-08-528398.
2. Sabih A, Babiker HM. Von Willebrand Disease. *StatPearls* [Internet] [Internet]. 2022 25 de outubro de 2022. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459222/>.
3. Peyvandi F, Garagiola I, Baronciani L. Role of von Willebrand factor in the haemostasis. *Blood Transfus*. 2011;9 Suppl 2:s3-8 DOI: 10.2450/2011.002S.
4. Sharma R, Haberichter SL. New advances in the diagnosis of von Willebrand disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2019;2019(1):596-600 DOI: 10.1182/hematology.2019000064.
5. Lavin M, Aguila S, Dalton N, Nolan M, Byrne M, Ryan K, et al. Significant gynecological bleeding in women with low von Willebrand factor levels. *Blood Adv*. 2018;2(14):1784-91 DOI: 10.1182/bloodadvances.2018017418.
6. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC, Favaloro EJ, Hill FG, Holmberg L, et al. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost*. 2006;4(10):2103-14 DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.02146.x.
7. Nichols WL, Hultin MB, James AH, Manco-Johnson MJ, Montgomery RR, Ortel TL, et al. von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia*. 2008;14(2):171-232 DOI: 10.1111/j.1365-2516.2007.01643.x.

8. Nichols WL, Rick ME, Ortel TL, Montgomery RR, Sadler JE, Yawn BP, et al. Clinical and laboratory diagnosis of von Willebrand disease: a synopsis of the 2008 NHLBI/NIH guidelines. *Am J Hematol.* 2009;84(6):366-70 DOI: 10.1002/ajh.21405.
9. Hassan MI, Saxena A, Ahmad F. Structure and function of von Willebrand factor. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2012;23(1):11-22 DOI: 10.1097/MBC.0b013e32834cb35d.
10. Lof A, Muller JP, Brehm MA. A biophysical view on von Willebrand factor activation. *J Cell Physiol.* 2018;233(2):799-810 DOI: 10.1002/jcp.25887.
11. Owen WG, Wagner RH. Antihemophilic factor: separation of an active fragment following dissociation by salts or detergents. *Thromb Diath Haemorrh.* 1972;27(3):502-15.
12. Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell.* 1996;84(2):289-97 DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80983-6.
13. Zhou YF, Eng ET, Zhu J, Lu C, Walz T, Springer TA. Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood.* 2012;120(2):449-58 DOI: 10.1182/blood-2012-01-405134.
14. Fogarty H, Doherty D, O'Donnell JS. New developments in von Willebrand disease. *Br J Haematol.* 2020;191(3):329-39 DOI: 10.1111/bjh.16681.
15. Rao ES, Ng CJ. Current approaches to diagnostic testing in von Willebrand Disease. *Transfus Apher Sci.* 2018;57(4):463-5 DOI: 10.1016/j.transci.2018.07.005.
16. Othman M, Kaur H, Emsley J. Platelet-Type von Willebrand Disease: New Insights into the Molecular Pathophysiology of a Unique Platelet Defect. *Semin Thromb Hemost.* 2013;39(06):663-73.
17. Bodo I, Eikenboom J, Montgomery R, Patzke J, Schneppenheim R, Di Paola J, et al. Platelet-dependent von Willebrand factor activity. Nomenclature and methodology: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2015;13(7):1345-50 DOI: 10.1111/jth.12964.
18. Flood VH, Gill JC, Morateck PA, Christopherson PA, Friedman KD, Haberichter SL, et al. Common VWF exon 28 polymorphisms in African Americans affecting the VWF activity assay by ristocetin cofactor. *Blood.* 2010;116(2):280-6 DOI: 10.1182/blood-2009-10-249102.
19. Vanhoorelbeke K, Cauwenberghs N, Vauterin S, Schlamadinger A, Mazurier C, Deckmyn H. A reliable and reproducible ELISA method to measure ristocetin cofactor activity of von Willebrand factor. *Thromb Haemost.* 2000;83(1):107-13.
20. Patzke J, Budde U, Huber A, Mendez A, Muth H, Obser T, et al. Performance evaluation and multicentre study of a von Willebrand factor activity assay based on GPIb binding in the absence of ristocetin. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2014;25(8):860-70 DOI: 10.1097/MBC.000000000000169.

21. Flood VH, Gill JC, Morateck PA, Christopherson PA, Friedman KD, Haberichter SL, et al. Gain-of-function GPIb ELISA assay for VWF activity in the Zimmerman Program for the Molecular and Clinical Biology of VWD. *Blood*. 2011;117(6):e67-74 DOI: 10.1182/blood-2010-08-299016.
22. Szederjesi A, Baronciani L, Budde U, Castaman G, Lawrie AS, Liu Y, et al. An international collaborative study to compare different von Willebrand factor glycoprotein Ib binding activity assays: the COMPASS-VWF study. *J Thromb Haemost*. 2018 DOI: 10.1111/jth.14206.
23. Boender J, Eikenboom J, van der Bom JG, Meijer K, de Meris J, Fijnvandraat K, et al. Clinically relevant differences between assays for von Willebrand factor activity. *J Thromb Haemost*. 2018;16(12):2413-24 DOI: 10.1111/jth.14319.
24. Saelman EU, Nieuwenhuis HK, Hese KM, de Groot PG, Heijnen HF, Sage EH, et al. Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (alpha 2 beta 1-integrin). *Blood*. 1994;83(5):1244-50.
25. Favaloro EJ. An update on the von Willebrand factor collagen binding assay: 21 years of age and beyond adolescence but not yet a mature adult. *Semin Thromb Hemost*. 2007;33(8):727-44 DOI: 10.1055/s-2007-1000364.
26. Timm A, Fahrenkrug J, Jorgensen HL, Sennels HP, Goetze JP. Diurnal variation of von Willebrand factor in plasma: the Bispebjerg study of diurnal variations. *Eur J Haematol*. 2014;93(1):48-53 DOI: 10.1111/ejh.12298.
27. Miller CH, Dilley AB, Drews C, Richardson L, Evatt B. Changes in von Willebrand factor and factor VIII levels during the menstrual cycle. *Thromb Haemost*. 2002;87(6):1082-3.
28. Laffan MA, Lester W, O'Donnell JS, Will A, Tait RC, Goodeve A, et al. The diagnosis and management of von Willebrand disease: a United Kingdom Haemophilia Centre Doctors Organization guideline approved by the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol*. 2014;167(4):453-65 DOI: 10.1111/bjh.13064.