

TEMAS TRATADOS

- ✓ Diferentes cinéticas de anticuerpos
- ✓ Muestras para la prueba de inhibidores de FVIII/ FIX: recolección, envío y preparación
- ✓ Plasma combinado normal para pruebas de inhibidores
- ✓ Protocolo para la prueba de inhibidores de FVIII y FIX
- ✓ Ensayos de inhibidores de factores de von Willebrand
- ✓ / Anticuerpo antifármaco (ADA) en el laboratorio de coagulación - emicizumab

Identificar el desarrollo de anticuerpos es vital para que el programa de tratamiento de la hemofilia pueda brindar una atención médica adecuada (Peyvandi et al, 2016; Srivastava et al, 2020). En el contexto de la hemofilia, los inhibidores son anticuerpos IgG policlonales contra el FVIII o FIX y en su mayoría de la subclase IgG4 de alta afinidad (Montalvão et al, 2015). Los inhibidores neutralizan el concentrado de factor administrado al paciente, lo que dificulta la prevención y el tratamiento de la hemorragia (Pratt et al, 2021). La aparición de los inhibidores es el resultado de un proceso de varias etapas en el que intervienen determinantes ambientales y genéticos. En la hemofilia A grave, los inhibidores del FVIII se forman en aproximadamente el 30% de los pacientes, generalmente durante los primeros 20 a 30 días de exposición. En la hemofilia B grave, la incidencia acumulada de desarrollo de inhibidores es menor que en la hemofilia A grave y alcanza el 4-5% entre 9 y 11 días después de la exposición (Ljung et al, 2019). El tratamiento de la hemorragia aguda en pacientes con inhibidores depende del título del inhibidor. Los pacientes con un título bajo de inhibidores (<5 UB/ml) pueden ser tratados con terapia sustitutiva estándar, factor concentrado, aunque requiere dosis más altas para superar los efectos neutralizantes del inhibidor. Para los pacientes con inhibidores de títulos altos (>5 UB/ml), las únicas terapias efectivas para tratar el sangrado son los agentes de derivación (Ljung et al, 2019). Los tres agentes de derivación disponibles que se utilizan en la hemofilia A y B son (1) concentrado de complejo de protrombina activado (aPCC), (2) dos formas de FVII activado recombinante (rFVIIa) y (3) FVIII porcino recombinante. En algunos países se dispone de fármacos hemostáticos recientemente desarrollados, como los anticuerpos biespecíficos humanizados (p. ej., emicizumab), el ARN de interferencia (p. ej., fitusiran) y los agentes inhibidores del factor tisular (anti-TFPI), entre otros, para prevenir la hemorragia. La inducción de tolerancia inmunológica (ITI) se utiliza para erradicar los inhibidores e implica inyecciones intravenosas frecuentes de concentrado de factor durante varios meses. En la hemofilia A, la ITI es eficaz en alrededor del 65 al 70% de los pacientes. El seguimiento de la titulación de inhibidores de estos pacientes es esencial para evaluar y manejar el protocolo. La investigación de laboratorio del inhibidor debe llevarse a cabo utilizando el método de Bethesda modificado. Aunque esta prueba tiene un CV (coeficiente de varianza) alto, es la prueba de referencia utilizada para valorar los anticuerpos inhibidores. En algunos casos, el cribado de inhibidores mediante la prueba de TTAP se puede llevar a cabo antes de ajustar la dosis de los anticuerpos. Sin embargo, debido a las limitaciones de la prueba, los resultados negativos no deben utilizarse para excluir la posible presencia de un inhibidor. Se puede encontrar más información en el capítulo 6 de este manual. Una alternativa al cribado de anticuerpos contra el FVIII o FIX es el uso de una prueba inmunológica. Se han estudiado diversos ensayos inmunológicos y, aunque estas pruebas son más sensibles que las pruebas funcionales, no discriminan entre anticuerpos inhibidores y no inhibidores y, por lo tanto, aún no son útiles

en la práctica clínica para detectar o monitorizar inhibidores funcionales. Sin embargo, los estudios han demostrado que los anticuerpos de la subclase IgG4 se correlacionan con los inhibidores funcionales de FVIII y FIX (Awasthi et al, 2022; Montalvão et al, 2015; Moorehead et al, 2015).

Diferentes cinéticas de los anticuerpos: Las diferentes cinéticas de los anticuerpos pueden afectar el análisis de los datos y, en consecuencia, dar lugar a interpretaciones erróneas. Cuando los inhibidores del FVIII o FIX actúan en una prueba de inhibición de manera dependiente de la dosis, como inactivando completamente el FVIII o FIX, estos inhibidores se denominan inhibidores de "Tipo I". Los inhibidores que demuestran un comportamiento cinético más complejo suelen denominarse inhibidores de "tipo II", que inactivan el FVIII de forma incompleta. Los inhibidores de tipo I generalmente se desarrollan en pacientes con hemofilia congénita A o B en respuesta al FVIII o concentrado del FIX, mientras que los inhibidores de tipo II generalmente se presentan en pacientes con hemofilia adquirida o hemofilia A leve. Los inhibidores de FVIII de tipo I dependen del tiempo y la temperatura porque su diana, el FVIII, forma un complejo con su proteína transportadora, el FVW. Los inhibidores de FIX no dependen del tiempo y la temperatura.

Muestras para la prueba del inhibidor de FVIII/FIX: recolección, envío y preparación:

Recogida y envío de muestras: Las muestras para los ensayos de inhibidores de FVIII y FIX se recogen en citrato trisódico al 3,2% (0,105-0,109 M), el mismo tipo de muestra que se utiliza para la mayoría de las pruebas de coagulación. La sangre entera citratada debe centrifugarse dentro de las 4 horas posteriores a la recolección de sangre, y la centrifugación debe ser de 1500 g durante 15 minutos. Las muestras de plasma positivas para inhibidores del FVIII y FIX, no sangre entera, pueden almacenarse a temperatura ambiente durante 1 semana, o congelarse a -70 °C y almacenarse hasta 15 años. Es importante recordar que, a diferencia de los procedimientos tradicionales de análisis de la coagulación, en este tipo de muestras es el anticuerpo el que se debe conservar. Esta información es muy útil para los laboratorios que necesitan enviar muestras a otro laboratorio para su análisis, ya que el transporte no depende del hielo seco.

Calentamiento de las muestras: Las muestras de pacientes utilizadas para la detección de inhibidores pueden contener FVIII exógeno o FIX debido a infusiones recientes de concentrado de factor, tales como: (1) profilaxis, (2) tratamiento de hemorragia, (3) terapia ITI o (4) FVIII endógeno o FIX si la prueba se realiza en hemofilia leve o moderada. La presencia de FVIII exógeno o FIX puede afectar significativamente la detección de inhibidores, con subestimación del título del inhibidor y resultados falsos negativos (Batty et al, 2014; De Lima Montalvão et al, 2015). El calentamiento de las muestras durante 30 minutos a 56 °C disocia el complejo antígeno-anticuerpo y desnaturaliza el factor. Para estandarizar la prueba, se recomienda que todas las muestras de prueba estén siempre precalentadas, incluso si no se espera FVIII o FIX exógeno. El procedimiento de calentamiento debe ir seguido de una etapa de centrifugación, de 2 minutos a 4000 g, para eliminar los residuos en el plasma causados por el calentamiento. Este paso de calentar las muestras para la prueba del inhibidor no se ha evaluado para todos los productos disponibles para el tratamiento del paciente. Por lo tanto, para cada producto de FVIII o FIX modificado molecularmente, debe demostrarse que el FVIII o FIX residual se deteriora debido al procedimiento de calentamiento. El emicizumab no se destruye por la etapa de precalentamiento; sin embargo, los inhibidores del FVIII se pueden medir en presencia de emicizumab utilizando un método del FVIII cromogénico bovino. Vale la pena recordar que algunos pacientes usan concentrado de factor y emicizumab concomitantemente, por lo que es necesario un tratamiento térmico.

Dilución de la muestra: Para valorar el inhibidor, la prueba debe realizarse con múltiples diluciones del plasma de prueba. La forma en que se selecciona el factor de dilución no se limita a un número específico, ya que depende de si se conoce el título del inhibidor anterior.

Plasma combinado normal para la prueba de inhibidores: Para evaluar la actividad del inhibidor en la muestra de prueba, es necesario presentar una fuente "externa" de FVIII o FIX para este inhibidor. Esta fuente externa se basa en el "pool" o combinación de plasma normal, por lo que es importante tener en

cuenta que cualquier error en esta etapa puede generar resultados falsos positivos y negativos. Al preparar un grupo para las pruebas de inhibidores, se debe medir la actividad del FVIII o FIX y la desviación de este valor debe controlarse durante el tiempo de almacenamiento o cuando se produce un nuevo lote. Se debe utilizar una combinación de plasma normal para garantizar que el nivel de FVIII o FIX esté cerca de 1 UI/ml (100 %). Un nivel más bajo de factor en el grupo plasmático normal puede resultar en una sobreestimación del título del inhibidor, mientras que un nivel más alto del factor puede resultar en una subestimación del título del inhibidor. Es aceptable una desviación máxima del 5% de 1 UI/ml de FVIII o FIX en la combinación de plasma normal. La fuente externa de FVIII o FIX se puede producir mediante la preparación de la combinación de plasma normal o a partir de una fuente comercial y se puede congelar o liofilizar. Se sugiere un mínimo de 20 donantes para obtener plasma con un nivel de FVIII o FIX cercano a 1 UI/ml. El FVIII es un factor de coagulación termolábil, lo que significa que, durante una incubación de 2 horas a 37 °C, habrá una pérdida significativa de la actividad del FVIII debido a un cambio en el pH. Para estabilizar el pH durante la incubación, el plasma normal utilizado debe amortiguarse. Esto se puede hacer usando solución amortiguadora de imidazol o solución amortiguadora HEPES.

Protocolo para la prueba de inhibidores de FVIII y FIX: En 1975, Kasper et al describieron un método para determinar los inhibidores de FVIII y FIX, y hasta la fecha, esta sigue siendo la prueba más estandarizada, conocida como la prueba de Bethesda. En 1995, se describió el método de Nijmegen, una modificación del ensayo de Bethesda, con algunas diferencias: (1) la introducción de un grupo tamponado para mejorar la estabilidad del FVIII durante la incubación, y (2) plasma deficiente en FVIII para usar en la mezcla de control. Este método modificado de Bethesda fue recomendado por la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH) como método de referencia para la prueba de inhibidores del FVIII (Verbruggen et al, 1995). La prueba del inhibidor es un método indirecto y se basa en el principio de la inactivación del factor de coagulación de una fuente externa conocida por el inhibidor en la muestra de prueba durante un período de incubación. Una unidad Bethesda se define como la cantidad de inhibidor que neutralizará el 50% de una unidad de FVIII añadida en 2 horas a 37 °C.

Reactivos y equipos:

- Solución amortiguadora para dilución (parte 1)
- Solución amortiguadora de imidazol o HEPES (abajo)
- Plasma normal combinado (parte 2)
- Plasma deficiente en FVIII
- Cefalina (reactivo TTPA)
- Tubos de plástico

Tabla 22. Solución amortiguadora de imidazol o HEPES

Solución amortiguadora	
Imidazol	Mezcle 1 parte de solución amortiguadora de imidazol 4M con 39 partes de plasma normal combinado. Después de mezclar, el pH debe ajustarse entre 7,3 y 7,5.
HEPES	Mezcle 1 parte de solución amortiguadora HEPES 1M con 9 partes de plasma normal combinado. Después de mezclar, el pH debe ajustarse entre 7,3 y 7,5.

Método: Preparar diluciones del plasma de prueba en tubos de plástico hasta un volumen final de 0,2 ml utilizando la solución amortiguadora para dilución. Las diluciones requeridas para cada paciente pueden cambiar. Un punto de partida sugerido sería comenzar con una muestra sin diluir y luego realizar diluciones de 1/2, 1/4, 1/8, etc.

Nota: Si el paciente se ha sometido previamente a un ensayo de inhibidores, el nivel puede proporcionar una guía aproximada sobre qué diluciones se deben utilizar. Pipetear 0,2 ml de plasma deficiente en FVIII en otro tubo de plástico. Esto servirá como un tubo de control.

Nota: En el ensayo original de Bethesda, se utilizó solución amortiguadora de imidazol para preparar una mezcla de control con el grupo de plasma normal. En el ensayo de Nijmegen, la solución amortiguadora de imidazol se sustituye por plasma deficiente en FVIII. Se han observado algunas diferencias entre el uso de plasma inmunodepletado con deficiencia de factor, plasma químicamente empobrecido y plasma congénitamente deficiente. Estas diferencias pueden deberse a la ausencia o presencia de FVW en el plasma, a la presencia de anticuerpos o a la presencia de fragmentos de FVIII. Dado que el FVW está presente en el grupo de plasma normal, no es necesario que el diluyente de la mezcla de control también contenga FVW y, para reducir los costes, el plasma con deficiencia de factor puede sustituirse por albúmina sérica bovina (BSA) al 4%. El BSA tamponado al cuatro por ciento es un sustituto fiable y económico del plasma FVIII o FIX y favorece la estandarización del método.

- ✓ Añadir 0,2 ml de plasma normal combinado tamponado al tubo de control y a las diluciones de plasma de prueba. El nivel de FVIII de todos los tubos será de aproximadamente 0,5 UI/ml. Se considera que esto significa que el grupo de plasma normal tamponado tiene 1 UI/ml de FVIII.
- ✓ Tapar, mezclar e incubar todos los tubos a 37°C durante 2 horas.
- ✓ Después de 2 horas, transfiera todos los tubos a un baño de hielo, a menos que el ensayo de FVIII deba realizarse inmediatamente.
- ✓ Realizar la prueba de FVIII en todas las mezclas de incubación utilizando el método habitual de ensayo de FVIII, método de una etapa o cromogénico (Parte 6).
- ✓ Lea el FVIII residual de cada mezcla de ensayo, utilizando el control al 100% (0,5 UI/ml).

Ensayo de inhibidor de factor

Parte 1



Parte 2

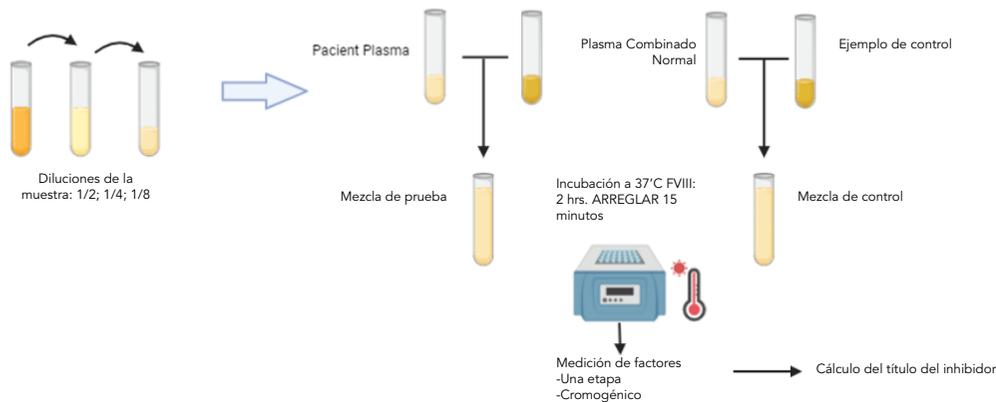


Figura 8. Procedimientos de ensayo de inhibidores

Resultados e interpretación: Para el cálculo del inhibidor se elige la dilución que dé un FVIII residual más cercano al 50%, pero dentro del rango del 25% al 75%. Cualquier FVIII residual de <25% o >75% no debe utilizarse para los cálculos del nivel de inhibidor. Se puede hacer un gráfico del % de FVIII residual frente a las unidades inhibitoras en papel log-log a partir de la definición de la unidad inhibitoria. Lea el nivel de inhibidor correspondiente al FVIII residual para cada mezcla de ensayo y corrija la dilución. Por ejemplo, si el valor más cercano al 50% del factor residual se encontró en la dilución 1/4 (es decir, en la mezcla 1/4 + pool normal), el resultado, que será cercano a 1 unidad Bethesda (BU), debe multiplicarse por 4.

- ✓ 1/4 de dilución + pool normal
- ✓ FVIII residual = 50%
- ✓ Unidad inhibidora (del gráfico) = 1 BU
- ✓ Multiplicar por el factor de dilución (1/4) = 4 BU

Nota: El ensayo del inhibidor se basa en la determinación del FVIII o FIX residual de la mezcla de plasma de prueba y control previamente incubado. Los ensayos de Bethesda y Nijmegen se desarrollaron utilizando un ensayo de factor de coagulación de una etapa. Sin embargo, las pruebas de inhibidores con este ensayo tienen limitaciones. La formación de coágulos en esta prueba puede verse afectada, por ejemplo, por el anticoagulante lúpico (inhibidores de la coagulación inespecíficos) y fármacos como el emicizumab. Una alternativa para evitar estos problemas es el uso de un método cromogénico. Otra ventaja de utilizar un método cromogénico en lugar de un ensayo de coagulación es la mayor precisión de los resultados. Una muestra de paciente sin diluir con actividad residual >75% puede reportarse como <0,4 BU/ml. En el caso de los inhibidores del FVIII, el Comité Científico y de Normalización (CSE) de la ISTH recomienda considerar positivo un resultado >0,6 BU/ml. Además de la curva de calibración, el título del inhibidor se puede calcular utilizando la fórmula: $(2 - \log \%RA) / 0,301$. En el caso de un inhibidor de tipo I, una curva del plasma de prueba de un paciente mostrará paralelismo con la curva de calibración. La falta de paralelismo con la curva de calibración indica un estándar de inhibidor cinético tipo II diferente. En el caso de los inhibidores con cinética de tipo II, utilice la dilución más baja que se acerque al 50% de la actividad residual para el cálculo final del título del inhibidor.

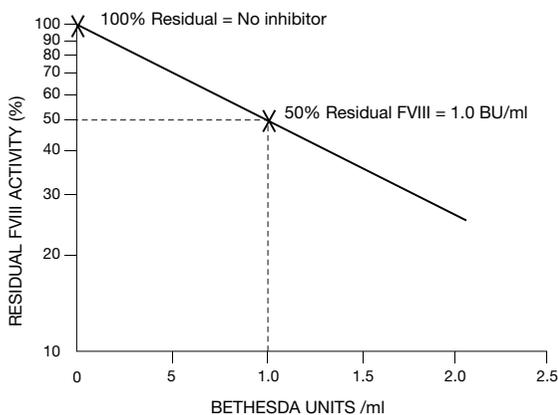


Figura 9. Cálculo de la actividad de los factores residuales

Notas: Los inhibidores funcionales de la hemostasia más frecuentemente encontrados son los anticoagulantes lúpicos, que no están dirigidos contra factores de coagulación específicos y cuya presencia debe excluirse antes de realizar pruebas para inhibidores de factores específicos. La cuantificación del título del inhibidor se lleva a cabo en el laboratorio, preferiblemente utilizando el ensayo de Bethesda modificado por Nijmegen Bethesda, ya que esta modificación ofrece una mayor especificidad y sensibilidad en comparación con el ensayo original de Bethesda. Los resultados positivos del inhibidor del FVIII por debajo de 2,0 BU pueden confirmarse con el método cromogénico, ya que tiene menos interferencia analítica y mayor precisión en comparación con el método de una etapa. El método cromogénico también es la mejor opción si se sospecha la presencia de anticoagulantes lúpicos en la muestra de prueba o si contiene anticoagulantes terapéuticos como heparina o inhibidores directos del FXa o FIIa. Todos los anticuerpos anti-FVII que no se detectan en el ensayo de Nijmegen-Bethesda pueden ser clínicamente relevantes porque pueden aumentar el aclaramiento del FVIII y pueden medirse mediante ELISA.

Ensayos de inhibidores del factor de von Willebrand: La EVW se considera el trastorno hemorrágico hereditario más común conocido en los seres humanos, con una prevalencia poblacional del 1% y una prevalencia sintomática de 1 en 1000 (Bowman et al, 2010). Las opciones de tratamiento incluyen la infusión

de concentrados de FVW, que generalmente también contienen FVIII, administrados para prevenir o tratar los episodios hemorrágicos. Los aloanticuerpos frente al FVW tienen una prevalencia de entre el 7 y el 9,5% (James et al, 2013; Pagliari et al, 2023). En estos casos, el tratamiento con concentrados de FVW es ineficaz, y se han notificado episodios de anafilaxia con exposición posterior al FVW (James et al, 2013). Como ya sabemos, la deficiencia de FVW puede explicarse por diferentes mecanismos derivados de los tipos de defectos genéticos identificados. Esta variabilidad de los defectos genéticos contribuye a una heterogeneidad de inhibidores dirigidos a diferentes epítomos de la molécula del FVW. Por esta razón, la detección en laboratorio de estos anticuerpos es un desafío (Connell et al, 2021; Miller, 2021; Sarji et al, 1974). En 1974, Sarji et al (1974) reportaron por primera vez de un caso de aloanticuerpos contra el FVW en un paciente con múltiples transfusiones. El inhibidor del FVW se midió utilizando un método análogo al método de Bethesda para los inhibidores del FVIII (Sarji et al, 1974). Aunque no existe una estandarización para la identificación de los inhibidores del FVW, el método de Bethesda ha sido utilizado por la mayoría de los laboratorios (Favaloro et al, 2022), con la diferencia de utilizar métodos que evalúan la actividad del FVW en lugar de la prueba del FVIII o FIX. Actualmente existen diferentes tipos de métodos disponibles para detectar la actividad del FVW, con diferentes sensibilidades y especificidades, por lo que es importante considerar que esta variabilidad de métodos influye en la sensibilidad y especificidad de la detección de estos inhibidores (Favaloro et al, 2022). Los anticuerpos contra el FVW no tienen las características de depender del tiempo y la temperatura, por lo que pueden evaluarse inmediatamente después de la prueba de mezcla (Sarji et al, 1974). El método clásico del cofactor de ristocetina, que evalúa la interacción del FVW con las plaquetas fijadas en presencia de ristocetina, así como el método de evaluación del colágeno y el método de ganancia de función, son opciones que ya han sido evaluadas y que han demostrado ser métodos con buena sensibilidad y estabilidad, a pesar de presentar resultados diferentes como se ha comentado anteriormente. Todavía no se han evaluado otros métodos disponibles para este tipo de investigación. También se han descrito métodos inmunológicos que detectan anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes. En relación con el desarrollo de autoanticuerpos que caracterizan la EVW adquirida, los pacientes con neoplasias mieloproliferativas (NMP) son un subgrupo que presenta complicaciones hemorrágicas relacionadas con la actividad del FVW. Se observan resultados falsos en muestras de pacientes con NMP, dependiendo de la tecnología aplicada. La investigación de laboratorio de los inhibidores del FVW caracterizados por aloanticuerpos y autoanticuerpos debe realizarse con cautela en vista de las diferentes posibilidades metodológicas. El rendimiento de todos los métodos modernos disponibles actualmente aún no está claro (Noye et al, 2024; Favaloro et al, 2022).

Anticuerpo antifármaco (ADA) en el laboratorio de coagulación - Emicizumab: El emicizumab es un anticuerpo biespecífico que se une a FIX/FIXa y FX/FXa humanos y actúa como un mimético de la función del FVIII. Sin embargo, no está regulado por los mecanismos que regulan el FVIII (Mahlangu et al, 2018, Mahlangu et al, 2022). La prueba de cribado de TTPA se reduce considerablemente con emicizumab (es decir, por debajo del rango de referencia, independientemente de los reactivos utilizados). El emicizumab afecta a todas las pruebas y ensayos de laboratorio basados en TTPA. El emicizumab también interfiere con los ensayos cromogénicos para medir el FVIII utilizando FIXa y FX humanos, pero no con los que utilizan FIXa y FX de origen bovino (Bowyer et al, 2021; Jenkins et al, 2020). El emicizumab puede medirse e reportarse en $\mu\text{g/ml}$ utilizando un ensayo modificado de una etapa con mayor dilución de la muestra y calibrado con calibradores específicos para emicizumab. Los anticuerpos antifármacos (ADA) pueden desarrollarse después de una dosis única o la administración repetida de una proteína terapéutica, y pueden afectar la farmacocinética, la farmacodinamia, la eficacia y/o la seguridad de esta proteína terapéutica. Los estudios que evalúan las características de la ADA en pacientes tratados con emicizumab muestran que la prueba de TTAP puede prolongarse junto con episodios hemorrágicos en presencia de anticuerpos con acción neutralizante (Novembrino et al, 2023; Valsecchi et al, 2021). En este caso, cuando se midió el nivel de emicizumab, mostró una reducción significativa. La actividad neutralizante de estos anticuerpos no se identificó claramente en los métodos funcionales, ni siquiera para el ensayo Bethesda modificado (Kaneda et al, 2021). El nivel de la unidad de Bethesda identificada parece ser más bajo de lo esperado en comparación con la prueba que mide el nivel de emicizumab. Todavía no se ha establecido el papel de las pruebas funcionales para el ADA, pero pueden ser complementarias a la medición del nivel plasmático

del fármaco en estos casos. La FMH recomienda medir los niveles de emicizumab utilizando un ensayo modificado de un solo paso con mayor dilución de la muestra y calibrado con calibradores específicos para emicizumab (Srivastava et al, 2020).

Referencias

- Awasthi NP, Tiwari V, Riaz K, Arshad S, Husain N. Análisis revelador y IgG4 del factor VIII en pacientes con hemofilia-A con y sin inhibidores. *Transfus Apher Sci* 2022; 61(3): 103343.
- Batty P, Platton S, Bowles L, Pasi KJ, Hart DP. El tratamiento térmico preanalítico y un ELISA FVIII mejoran la detección de anticuerpos contra el factor VIII en la hemofilia A adquirida. *BrJ Haematol* 2014; 166(6): 953-956.
- Bowman M, Hopman WM, Rapson D, Lillicrap D, James P. Prevalencia de la enfermedad de von Willebrand sintomática en la práctica de atención primaria. *J Thromb Haemost* 2010; 8(1): 213-216.
- Bowyer AE, Lowe AE, Tiefenbacher S. Problemas de laboratorio en terapia génica y emicizumab. *Hemofilia* 2021; 27 Supl 3: 142-147.
- Connell NT, Flood VH, Brignardello-Petersen R, Abdul-Kadir R, Arapshian A, Couper S et al. ASH I STH NHF FMH 2021 Guías sobre el tratamiento de la enfermedad de von Willebrand. *Sangre Adv* 2021; 5(1): 301-325.
- de Lima Montalvão SA, Tucunduva AC, de Almeida Sambo AL, De Paula EV, de Souza Medina S, Ozelo MC. El tratamiento térmico de las muestras mejora el rendimiento del ensayo Nijmegen-Bethesda en pacientes con hemofilia A sometidos a inducción de tolerancia inmune. *Thromb Res* 2015; 136(6): 1280-1284.
- Favaloro EJ, Dean E, Arunachalam S, Vong R, Mohammed S. Evaluación de errores en la identificación de laboratorio de la enfermedad de von Willebrand utilizando ensayos contemporáneos de factores de von Willebrand. *Patología* 2022; 54(3): 308-317.
- James PD, Lillicrap D, Mannucci PM. Aloanticuerpos en la enfermedad de von Willebrand. *Sangre* 2013; 122(5): 636-640.
- Jenkins PV, Bowyer A, Burgess C, Gray E, Kitchen S, Murphy P, Platton S, Riddell A, Chowdary P, Lester W. Pruebas de coagulación de laboratorio y tratamiento con emicizumab: una guía de la Organización de Médicos del Centro de Hemofilia del Reino Unido. *Hemofilia* 2020; 26(1): 151-155.
- Kaneda M, Kawasaki R, Matsumoto N, Abe H, Tashiro Y, Inokuchi Y et al. Análisis detallado de la eficacia del fármaco que disminuye la eficacia del fármaco contra el anti-emicizumab, utilizando muestras de plasma de un paciente con hemofilia A. *J Thromb Haemost* 2021; 19(12): 2938-2946.
- Ljung R, Auerswald G, Benson G, Dolan G, Duffy A, Hermans C et al. Inhibidores en la hemofilia A y B: tratamiento de las hemorragias, erradicación de inhibidores y estrategias para pacientes difíciles de tratar. *EurJ Haematol* 2019; 102(2): 111-122.
- Mahlangu J, Iorio A, Kenet G. Actualización del estado del arte de emicizumab. *Hemofilia* 2022; 28 Supl 4(Supl 4): 103-110.
- Mahlangu J, Oldenburg J, Paz-Priel I, Negrier C, Niggli M, Mancuso ME et al. Profilaxis con emicizumab en pacientes que tienen hemofilia A sin inhibidores. *N Engl J Med* 2018; 379(9): 811 -822.
- Molinero GH. Monitorización de los inhibidores del factor de von Willebrand en pacientes con enfermedad de von Willebrand tipo 3 mediante un ensayo cuantitativo. *Hemofilia* 2021; 27(5): 823-829.
- Montalvão S.A., Tucunduva AC, Siqueira LH, Sambo AL, Medina SS, Ozelo M.C. Una evaluación longitudinal de los anticuerpos anti-FVIII demostró que la subclase IgG4 se correlaciona principalmente con el inhibidor de alto título en pacientes con hemofilia A. *Hemofilia* 2015; 21(5): 686-692.
- Moorehead PC, Thibeault L, Tuttle A, Grabel J, Dwyre L, Silva M, James P, Lillicrap D. Adquisición rápida de tolerancia inmunológica al factor VIII y desaparición del antifactor VIII IgG4 después de la terapia profiláctica en un paciente con hemofilia A con inhibidor del factor VIII de título alto. *J Pediatr Hematol Oncol* 2015; 37(4): e220-222.
- Novembrino C, Boscolo-Anzoletti M, Galbiati E, Shinohara S, Peyvandi F. Efecto de los anticuerpos neutralizantes de emicizumab en los resultados de la prueba de tiempo de coagulación basada en el tiempo de tromboplastina parcial activada en pacientes tratados con emicizumab. *Res Pract Thromb Haemost* 2023; 7(8): 102260.

Noye J, Beggs J, Mason J. Los resultados discrepantes de la baja actividad del factor de von Willebrand en el analizador ACL TOP son frecuentes en pacientes no seleccionados con neoplasias mieloproliferativas y no muestran correlación con la pérdida de multímero de alto peso molecular o el fenotipo de sangrado. *J Thromb Haemost* 2024; 22(4): 965-974.

Pagliari MT, Budde U, Baronciani L, Eshghi P, Ahmadinejad M, Badiie Z et al. Aloanticuerpos neutralizantes y no neutralizantes del factor de Von Willebrand en 213 sujetos con enfermedad de von Willebrand tipo 3 inscritos en 3WINTERS-IPS. *J Thromb Haemost* 2023; 21(4): 787-799.

Peyvandi F, Garagiola I, Young G. Pasado y futuro de la hemofilia: diagnóstico, tratamientos y sus complicaciones. *Lancet* 2016; 388(10040): 187-197.

Pratt KP, Arruda VR, Lacroix-Desmazes S. Inhibidores-Perspectivas recientes. *Hemofilia* 2021; 27 Supl 3: 28-36.

Sarji KE, Stratton RD, Wagner RH, Brinkhous KM. Naturaleza del factor von Willebrand: un nuevo ensayo y un inhibidor específico. *Proc Natl Acad Sci US A* 1974; 71(8): 2937-2941.

Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW et al. Guías de la FMH para el tratamiento de la hemofilia, 3.ª edición. *Hemofilia* 2020; 26 Supl 6: 1-158.

Valsecchi C, Gobbi M, Beeg M, Adams T, Castaman G, Schiavone L, Huntington JA, Peyvandi F. Caracterización del anticuerpo neutralizante anti-emicizumab en un paciente con hemofilia A e inhibidor. *J Thromb Haemost* 2021; 19(3): 711-718.

Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E. La modificación de Nijmegen del ensayo de Bethesda para los inhibidores del factor VI11:C: especificidad y fiabilidad mejoradas. *Thromb Haemost* 1995; 73(2): 247-251.