
TÓPICOS ABORDADOS

- | | |
|---|--|
| ✓ Ensaio dos Fatores VIII e IX: Métodos | ✓ Monitoramento Pós-Infusão de FVIII e FIX |
| ✓ de Um Estágio e Cromogênico | ✓ Terapia Gênica |
| ✓ Realização de Ensaio de Fatores em Analisadores | ✓ Aspectos Laboratoriais para Tratamento com Terapia |
| Cujo Software Utiliza Diluição Única | de Reequilíbrio da Hemostasia |
| ✓ Anticorpos Biespecíficos | |
-

Ensaio dos Fatores VIII e IX: Métodos de Um Estágio e Cromogênico: o diagnóstico laboratorial de hemofilia A ou B é feito pela medição da atividade do fator (Srivastava et al, 2020). A metodologia mais comumente usada é o ensaio de coagulação de um estágio baseado no TTPA. O ensaio de um estágio para atividade do FVIII é descrito nesta seção. O ensaio se baseia na comparação da capacidade de diluições de plasmas padrão e de teste para corrigir o TTPA de plasma totalmente deficiente em FVIII, mas que contém todos os outros fatores necessários para a coagulação normal. Para os fatores IX, XI e XII, o ensaio é essencialmente igual e é realizado pela substituição do plasma deficiente relevante por plasma deficiente em FVIII e após a seleção do plasma de referência apropriado (Baker et al, 2020). O ensaio de FVIII ou FIX de um estágio não pode ser realizado na presença de anticorpos biespecíficos, como emicizumabe (Jenkins et al, 2020).

Reagentes:

- ✓ Plasma de teste citratado pobre em plaquetas
- ✓ Plasma padrão (de referência/calibrador)

O plasma padrão (de referência) utilizado deve ser um pool de plasma preparado localmente e mantido a -70°C ou menos, ou plasma padrão comercial. Em ambos os casos, esse plasma de referência deve ser calibrado para o ensaio de coagulação de acordo com o padrão internacional vigente para FVIII ou FIX no plasma. Não é aceitável presumir que um pool de plasma normal tenha 100 UI/dL.

- ✓ Plasma de controle de qualidade interno (CLSI, 2016)
- ✓ Plasma deficiente em FVIII

Esse plasma está disponível comercialmente ou pode ser coletado de um doador com hemofilia nas seguintes condições:

- ✓ Nível menor que 1 UI/dL
- ✓ Sem histórico de anticorpos contra FVIII
- ✓ Não recebeu tratamento por duas semanas, incluindo terapia de meia-vida estendida (EHL) ou terapia com anticorpos biespecíficos
- ✓ Testes de função hepática normais

Função hepática anormal pode levar à redução de outros fatores de coagulação, o que afeta a especificidade do ensaio. Esse plasma pode ser armazenado em alíquotas a -20°C ou menos por aproximadamente 1 mês (Woodhams et al, 2001; Zhao et al, 2018). É preferível utilizar plasma deficiente em FVIII/FIX produzido por imunodepleção de FVIII ou FIX de plasma normal usando um anticorpo monoclonal. Esse tipo de material está disponível comercialmente e tem a vantagem de maior segurança viral em comparação com o plasma proveniente de pacientes com hemofilia tratados com produtos derivados de plasma. Entretanto, nem todos os

plasmas imunodepletados são <1 UI/dL, e deve-se ter cuidado ao verificar isso antes do uso. Alguns especialistas consideram que a presença de concentrações normais de FVW no plasma deficiente em FVIII/FIX pode ser uma vantagem, e há evidências que corroboram essa afirmação em relação aos ensaios realizados como parte das determinações de inibidores (Verbruggen et al, 2001).

- ✓ Reagente de TTPA sensível a deficiências de fatores (CLSI, 2016)
- ✓ Solução salina tamponada de Owren (OBS ou tampão glicoxalina; consulte a seção sobre reagentes)
- ✓ CaCl_2 25 mM (observe que o CaCl_2 da Werfen fornecido com SynthASil é 20 mM)

Método:

- ✓ Faça diluições de 1/10 de plasma padrão, de CQ e teste em solução salina tamponada em tubos plásticos (se for esperado que o plasma de teste tenha um nível muito baixo de FVIII, comece com diluição de 1/5.)
- ✓ Usando volumes de 0,2 mL, faça diluições duplas em OBS de plasma padrão, de CQ e teste de 1/10 a 1/40 em tubos plásticos (misture bem cada diluição antes de transferir para o próximo tubo). As diluições de plasma devem ser testadas imediatamente após a preparação. Se a temperatura ambiente exceder 25°C, pode ser necessário manter as diluições em gelo úmido antes do teste.
- ✓ Pipete 0,1 mL de cada diluição padrão para um tubo de vidro de 75 x 10 mm.
- ✓ Adicione 0,1 mL de plasma deficiente em FVIII e transfira para banho-maria a 37°C.
- ✓ Adicione 0,1 mL de reagente de TTPA e incube por 5 minutos.
- ✓ Aos 5 minutos, adicione 0,1 mL de CaCl_2 e registre o tempo de coagulação.
- ✓ Um “branco” também deve ser preparado utilizando 0,1 mL de OBS em vez de plasma de teste.

O tempo de coagulação do branco deve ser maior que o tempo de atividade de FVIII de 1% do padrão no gráfico de calibração. Se o tempo for menor, isso indica que o plasma substrato não é totalmente deficiente em FVIII e, portanto, não é um plasma substrato adequado.

Resultados: a representação gráfica dos resultados requer papel milimetrado com escala logarítmica dupla ou logarítmica/linear. A diluição de 1/10 recebe arbitrariamente o valor de 100%, a diluição de 1/20, o valor de 50%, e a diluição de 1/40, o valor de 25%. Se utilizada, a diluição de 1/5 tem o valor de 200%. Linhas retas, paralelas entre si, devem ser obtidas. Leia a concentração da amostra de teste conforme mostrado na Figura 7. Nesse exemplo, a concentração de FVIII na amostra de teste é 7% daquela no padrão. Se o padrão tiver concentração de FVIII de 85 UI/dL, a amostra de teste terá concentração de $85 \text{ UI/dL} \times 7\% = 6 \text{ UI/dL}$. Se as linhas não forem paralelas, o ensaio deve ser repetido. Linhas não paralelas podem ocorrer devido a erros técnicos. Se o erro técnico tiver sido eliminado, pode ser devido à presença de um inibidor, que pode agir especificamente contra o FVIII, ou pode ser do tipo “lúpico”, apresentando padrão convergente. Linhas divergentes são típicas de uma amostra ativada ou da presença de um DOAC (Baker et al, 2020).

Observações: se a concentração de FVIII (ou FIX) no plasma de teste for próxima de zero (ou seja, se os tempos de coagulação de todas as diluições forem semelhantes aos do branco), podem ocorrer linhas não paralelas. A presença de anticoagulante lúpico pode interferir nos fosfolípidios dos reagentes de TTPA e produzir ensaios de fatores não paralelos (Ruinemans-Koerts et al, 2001). A faixa normal deve ser estabelecida localmente, mas com frequência apresenta limite inferior de 50 a 65 UI/dL para FVIII e FIX. O monitoramento exato de alguns produtos de EHL por ensaio de um estágio pode ser afetado pelo reagente de TTPA utilizado (Gray et al, 2020). Consulte a Parte 6 sobre EHL. Ensaios de FVIII ou FIX de um estágio não podem ser realizados na presença de anticorpos biespecíficos, como emicizumabe. Esses medicamentos encurtam artificialmente o TTPA. O tempo de coagulação curto em um ensaio de um estágio corresponde a alta atividade do fator (Jenkins et al, 2020; Bowyer et al, 2020; Bowyer et al, 2023). Consulte a Parte 6 sobre anticorpos biespecíficos. Discrepância no FVIII entre ensaio de um estágio e cromogênico foi descrita na hemofilia A leve em algumas áreas geográficas e raramente na hemofilia B leve (Pouplard et al, 2009). Se possível, um novo diagnóstico de hemofilia leve deve incluir FVIII:C ou FIX:C também medidos por ensaio cromogênico (Bowyer et al., 2018). Ensaios de FVIII de um estágio podem ser usados para medir a terapia com FVIII recombinante suíno (Bowyer et al., 2022). Há uma mutação no FIX, FIX Padua (p.R338L), que apresenta atividade de FIX oito vezes maior que a do antígeno (Simioni et al, 2009).

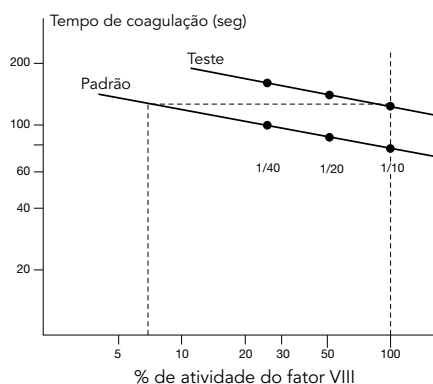


Figura 7. Gráfico do ensaio de FVIII

As amostras de teste devem ser analisadas utilizando três diluições diferentes da amostra, conforme descrito acima. Essa é uma recomendação consistente em diretrizes nacionais e internacionais publicadas, incluindo as da WFH. Ela melhora a exatidão e a precisão do ensaio em comparação com o uso de uma única diluição da amostra de teste. Às vezes, os ensaios de fatores são realizados em analisadores com software projetado para testar apenas uma única diluição da amostra de teste. A seção a seguir descreve um método que pode ser usado para incluir três diluições da amostra de teste nesses analisadores.

Realização de Ensaios de Fatores em Analisadores cujo Software Utiliza Diluição Única da Amostra de Teste:

a WFH recomenda que ensaios baseados em TTPA de um estágio para FVIII e FIX sejam realizados utilizando três diluições diferentes da amostra de teste. Isso é descrito no seguinte documento:

Diretrizes da WFH para Manejo da Hemofilia, 3ª edição. Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW, Carcao M, Mahlangu J, Ragni MV, Windyga J, Llinás A, Goddard NJ, Mohan R, Poonnoose PM, Feldman BM, Lewis SZ, van den Berg HM, Pierce GF; Capítulo 3: Diagnóstico e Monitoramento Laboratorial. Steve Kitchen, Francisco de Paula Careta, Silmara A de Lima Montalvão, Emna Gouider, Radoslaw Kaczmarek, Claude T. Tagny, Pierre Toulon, Glenn F. Pierce, Alok Srivastava. Haemofilia 2020; 26 (Supl 1): 35-48.

O documento completo está disponível para download gratuito no site da WFH por meio do seguinte link:

[Guidelines for the Management of Hemophilia – Plataforma de eLearning \(wfh.org\)](https://www.wfh.org/publications-and-documents/guidelines-for-the-management-of-hemophilia-plataforma-de-elearning)

O texto a seguir foi reproduzido da diretriz da WFH:

Recomendação: Para a investigação laboratorial decorrente de uma suspeita clínica de hemofilia usando ensaios de FVIII/FIX de um estágio, a WFH recomenda a análise usando três diluições diferentes das amostras de plasma de referência e de teste.

OBSERVAÇÃO: Os resultados das diluições de plasma de teste e padrão devem ser comparados por análise em linha paralela. Um modo para realizar essa avaliação consiste em calcular o coeficiente de variação (CV) dos três resultados usando a equação $CV = \left(\frac{\text{desvio padrão}}{\text{média}} \times 100 \right)$. Se o CV dos três resultados for menor que 15%, então a média dos três resultados deve ser relatada. Se o CV for maior que 15%, os resultados devem ser examinados com atenção. A presença de inibidores patológicos contra fatores de coagulação específicos ou anticoagulantes lúpicos pode interferir em alguns ensaios de FVIII e FIX de um estágio. Alguns anticoagulantes terapêuticos também podem exibir esse efeito de interferência. Em todos esses contextos, a atividade do fator aumenta no ensaio conforme o plasma é progressivamente diluído. A atividade do fator é subestimada quando o plasma é menos diluído e um resultado de atividade mais exato é obtido quando o plasma de teste é mais diluído.

Os princípios acima também devem ser aplicados a ensaios de um estágio para outros fatores de coagulação (ou seja, FII, FV, FVII, FX, FXI e FXII). Alguns analisadores possuem software que permite mais de uma diluição da amostra de teste. Nesses analisadores, a amostra de teste é apresentada para análise e o analisador constrói as diferentes diluições, executa o ensaio e calcula a atividade do fator de coagulação a ser analisado. Outros analisadores possuem software que permite apenas uma única diluição da amostra de teste. O procedimento abaixo pode ser usado nesses analisadores para que as recomendações da WFH possam ser seguidas com maior exatidão e precisão do ensaio.

Os exemplos fornecidos são para ensaios de FVIII, mas podem ser usados para ensaios de um estágio de outros fatores.

- ✓ As amostras de teste são colocadas no analisador não diluídas (ou seja, sem qualquer pré-diluição pelo operador).
- ✓ A amostra de teste é pré-diluída na proporção de 1:2 pelo operador com o mesmo tampão de ensaio utilizado pelo analisador, que geralmente é o tampão de Owren, mas pode ser um tampão diferente.
- ✓ Isso pode ser feito em tubos ou frascos de plástico que possam ser apresentados ao analisador para análise e que não causem ativação da amostra de teste.
- ✓ A amostra de teste é pré-diluída na proporção de 1:4 com o mesmo tampão de ensaio utilizado pelo analisador (vide pontos 2 e 3 acima).
- ✓ Isso significa que o analisador recebe três materiais diferentes derivados da mesma amostra de teste.
- ✓ O analisador é então solicitado a executar um ensaio de FVIII em cada um desses três materiais (ou seja, amostra de teste não diluída, amostra de teste pré-diluída 1:2 e amostra de teste pré-diluída 1:4).
- ✓ Um resultado de FVIII é obtido na amostra de teste não diluída.
- ✓ Outro resultado é obtido na amostra de teste que foi pré-diluída 1:2. Esse deve ser multiplicado por 2 para corrigir a pré-diluição.
- ✓ Outro resultado é obtido na amostra de teste que foi pré-diluída 1:4. Esse deve ser multiplicado por 4 para corrigir a pré-diluição.
- ✓ Os três números são então comparados pelo operador.
- ✓ Normalmente, os três números são muito próximos. Nesse caso, o operador consegue calcular e relatar a média dos três números como a atividade de FVIII da amostra de teste.
- ✓ Às vezes, os três números não são próximos. Isso pode ocorrer se a amostra contiver substâncias interferentes ou se a coagulação tiver sido ativada na amostra (por exemplo, talvez devido a dificuldades durante a coleta da amostra).
- ✓ O operador deve decidir se é seguro usar a média das três respostas diferentes.
- ✓ A WFH recomenda o uso de uma avaliação matemática simples para decidir.
- ✓ Isso é feito calculando o CV dos três resultados diferentes.
- ✓ A média dos três resultados diferentes pode ser usada com segurança se o CV for <15%.
- ✓ O uso da média dessa maneira melhora a precisão do teste.
- ✓ Se o CV for maior que 15%, o operador terá mais decisões a considerar.
- ✓ Quando o nível do fator for 10 a 15 UI/dL, o CV das três diluições é maior do que quando a atividade do fator está em níveis mais altos. Nessas amostras, um CV de 20% pode ser aceito.
- ✓ Quando o nível do fator estiver abaixo de 5 UI/dL, pré-diluição de 1:4 pode reduzir a atividade do fator abaixo do limite inferior de quantificação, dependendo dos reagentes. Nessas amostras, é aceitável testar apenas a amostra de teste não diluída e a amostra de teste pré-diluída 1:2. Nesse caso, o laboratório deve relatar a média dos dois resultados (após multiplicar o resultado do analisador da diluição 1:2 por 2), sem cálculo do CV.
- ✓ Para amostras com FVIII >15 UI/dL, se o CV for >15% e o resultado no plasma não diluído for menor que os resultados na terceira diluição, isso indica que pode haver uma substância interferente na amostra de teste. Nesse caso, o resultado obtido para a diluição 1:4 (após multiplicação do resultado do analisador por 4 para corrigir a pré-diluição) será o mais exato (veja os exemplos abaixo).
- ✓ Exemplos de substâncias interferentes que podem causar esse resultado falsamente baixo nas amostras de teste não diluídas são inibidores como anticoagulante lúpico, HNF, DTIs ou inibidores diretos de FXa.
- ✓ O uso de uma única diluição pode levar a resultados falsamente baixos e ensaios extremamente inexatos.

Alguns exemplos são apresentados abaixo.

Tabela 12. Exemplo 1 - Ensaio de FVIII com pré-diluição manual

	Atividade do FVIII registrada pelo analisador	Atividade do FVIII após correção da pré-diluição	Comentários
Amostras de teste sem pré-diluição	25 UI/dL (%)	25 UI/dL (%)	Nenhuma pré-diluição pelo operador, portanto o resultado não muda
Amostras de teste diluídas 1:2 antes da análise	13,5 UI/dL (%)	27 UI/dL (%)	Resultado do analisador multiplicado por 2
Amostras de teste diluídas 1:4 antes da análise	6 UI/dL	24 UI/dL (%)	Resultado do analisador multiplicado por 4

- ✓ A média dos três resultados é 25,3 UI/dL (%).
- ✓ O desvio padrão dos três resultados é 1,53.
- ✓ O CV dos três resultados é 6,0%.
- ✓ O CV é <15%, portanto o resultado relatado é **25,3 UI/dL (%)**.

Tabela 13. Exemplo 2 - Ensaio de FVIII com pré-diluição manual

	Atividade do FVIII registrada pelo analisador	Atividade do FVIII após correção da pré-diluição	Comentários
Amostras de teste sem pré-diluição	62 UI/dL (%)	62 UI/dL (%)	Nenhuma pré-diluição pelo operador, portanto o resultado não muda
Amostras de teste diluídas 1:2 antes da análise	33 UI/dL (%)	66 UI/dL (%)	Resultado do analisador multiplicado por 2
Amostras de teste diluídas 1:4 antes da análise	13 UI/dL	52 UI/dL (%)	Resultado do analisador multiplicado por 4

- ✓ A média dos três resultados é 60,0 UI/dL (%).
- ✓ O desvio padrão dos três resultados é 7,2.
- ✓ O CV dos três resultados é 12,0%.
- ✓ O CV é <15%.
- ✓ O resultado relatado é **60,0 UI/dL (%)**.

Tabela 14. Exemplo 3 - Ensaio de FVIII com pré-diluição manual

	Atividade do FVIII registrada pelo analisador	Atividade do FVIII após correção da pré-diluição	Comentários
Amostras de teste sem pré-diluição	7,0 UI/dL (%)	7,0 UI/dL (%)	Nenhuma pré-diluição pelo operador, portanto o resultado não muda
Amostras de teste diluídas 1:2 antes da análise	3,0 UI/dL (%)	6,0 UI/dL (%)	Resultado do analisador multiplicado por 2
Amostras de teste diluídas 1:4 antes da análise	2,1 UI/dL	8,4 UI/dL (%)	Resultado do analisador multiplicado por 4

- ✓ A média dos três resultados é 7,1 UI/dL (%).
- ✓ O desvio padrão dos três resultados é 7,1.
- ✓ O CV dos três resultados é 16,9%.
- ✓ O CV é <20%.
- ✓ O resultado relatado é **7,1 UI/dL (%)**.

Tabela 15. Exemplos com substâncias interferentes presentes, os resultados do ensaio de FVIII estão em UI/dL (%)

Interferência	Sem pré-diluição	Pré-diluída 1:2		Pré-diluída 1:4		Resultados usados para calcular o CV	CV
		Resultado do analisador	Resultado corrigido pelo operador	Resultado do analisador	Resultado corrigido pelo operador		
Inibidor direto da trombina	46,5	34,0	68,0	18,5	74,0	46,5, 68,0, 74,0	23,0%
Rivaroxabana	64,0	45,2	90,4	29,1	116,4	64,0, 90,4, 116,4	29,0%
Anticoagulante lúpico	25,3	19,3	38,6	16,2	64,8	25,3, 38,6, 64,8	46,8%

- ✓ Observe que padrões semelhantes ocorrem em outros ensaios de um estágio, como de FIX.
- ✓ Todos os três apresentam CVs >15%.
- ✓ Os efeitos dessas substâncias interferentes são geralmente menores na amostra com diluição de 1:4 do que na amostra não diluída ou na amostra com pré-diluição de 1:2.
- ✓ O resultado da amostra de 1:4 ainda pode ser uma subestimação, mas é o mais próximo de um resultado exato dos três testes realizados. Também pode ser útil adicionar pré-diluição de 1:8 como um quarto teste nesses casos.
- ✓ Os resultados relatáveis dos exemplos na tabela podem ser >74 UI/dL (%), >116,4 UI/dL (%) ou >64,8 UI/dL (%).

Todas as três amostras de teste neste exemplo apresentam atividade de FVIII que não está reduzida abaixo da faixa normal. A confirmação de que a atividade não está reduzida às vezes é suficiente para o manejo seguro do paciente.

Ensaios cromogênicos de FVIII:C e FIX: o diagnóstico laboratorial de hemofilia A ou B é feito pela medição da atividade do fator (Srivastava et al, 2020). A metodologia mais comumente utilizada é o ensaio de coagulação de um estágio baseado no TTPA (OSA). Há limitações no ensaio de estágio, inclusive interferência se anticoagulantes lúpicos, anticoagulantes orais diretos (DOACs) ou terapias de meia-vida prolongada para hemofilia, incluindo anticorpos biespecíficos, estiverem presentes (Gray et al, 2020; Jenkins et al, 2020; Bowyer et al, 2021; Moser et al, 2021; Ruinmans-Koerts et al, 2010). Mais importante ainda, hemofilia A leve não é excluída pelo achado de nível normal de FVIII:C, e raramente de FIX:C, no OSA (Pouplard et al, 2009). Vários grupos relataram que um subgrupo de pacientes com hemofilia A leve apresenta discrepância entre a atividade do FVIII determinada por meio de diferentes tipos de ensaios (Pavlova et al, 2014). Mais de 20% dos pacientes com hemofilia A leve estão associados a discrepância na qual a atividade cromogênica é duas vezes ou menor que a do OSA e o fenótipo de sangramento é compatível com o ensaio de substrato cromogênico (CSA) (Bowyer et al, 2018). Uma forma reversa de discrepância de ensaios também pode ocorrer com FVIII:C duas ou mais vezes menor pelo OSA do que pelo CSA. Relatos de sangramento são muito menores nesses pacientes (Bowyer et al, 2018; Bowyer et al, 2011). Exemplos de resultados nesses pacientes são mostrados na Tabela 16.

Tabela 16. Exemplos de pacientes com hemofilia A leve confirmada geneticamente e discrepâncias de ensaios

Caso	Ensaio de um estágio (UI/dL)	Ensaio cromogênico (UI/dL)
A	101	13
B	88	28
C	15	69
D	55	40
E	58	33
F	72	36
G	84	45

Com base nesses resultados, é vantajoso que todos os centros de hemofilia tenham um ensaio cromogênico de FVIII disponível. CSA deve ser realizado em indivíduos com TTPA normal e atividade de FVIII em um estágio, na presença de histórico pessoal ou familiar consistente com hemofilia leve. Os CSAs de FVIII foram introduzidos pela primeira vez no início da década de 1980 (Rosen et al, 1984) e vários fabricantes possuem kits comerciais para ensaio cromogênico de FVIII. Muitos deles são adequados para o diagnóstico de hemofilia A na presença de atividade normal de FVIII em um estágio. Um pequeno número de CSAs de FIX está disponível desde meados da década de 2010 e, em sua maioria, limita-se a laboratórios de pesquisa ou de hemostasia especializados (Kershaw et al, 2018). Discrepância no FIX entre ensaio de um estágio e cromogênico foi descrita na hemofilia B leve, mas a discrepância parece comprometer a classificação da gravidade, com os pacientes alternando entre hemofilia B moderada e leve (Pouplard et al, 2009; Truedsson et al, 2020).

Princípio de análise para CSA de FVIII: muitos coagulômetros automatizados têm a capacidade de realizar CSA, mas como esses ensaios eram originalmente realizados de forma manual usando placas de microtitulação, ainda é possível usar um método manual. Em alguns (mas não todos) ensaios cromogênicos, todo o FVIII na amostra é ativado pela trombina. O FVIII ativado então acelera a conversão de FX em FXa na presença de FIX ativado, fosfolipídios e íons de cálcio. A atividade de FXa é avaliada pela hidrólise de um substrato p-nitroanilina específico para FXa. A taxa inicial de liberação de p-nitroanilina (cor amarela) medida a 405 nm é proporcional à atividade do FXa e, por conseguinte, à atividade do FVIII na amostra. Os resultados do plasma do paciente e da amostra de controle de qualidade são comparados com o plasma padrão (de referência/calibrador) para quantificar o CSA utilizando os mesmos princípios do OSA (Baker et al, 2020). As proteínas usadas nos kits de CSA de FVIII podem ser de origem humana ou bovina. Para medição de FVIII:C endógeno ou terapia com FVIII de meia-vida estendida ou padrão, a fonte de proteínas não afeta o CSA. A fonte de proteínas é importante quando anticorpos biespecíficos estão presentes no plasma (consulte a seção Parte 6 sobre anticorpos biespecíficos).

Princípio de análise para CSA de FIX: em alguns (mas não todos) ensaios cromogênicos de FIX, todo o FIX na amostra é ativado por FXIa. O FIX ativado então acelera a conversão de FX em FXa na presença de FVIII ativado, fosfolipídios e íons de cálcio. A atividade de FXa é avaliada pela hidrólise de um substrato de p-nitroanilina específico para FXa. A taxa inicial de liberação de p-nitroanilina (cor amarela) medida a 405 nm é proporcional à atividade do FXa e, por conseguinte, à atividade do FIX na amostra, conforme descrito acima.

Observações: se a concentração de FVIII (ou FIX) no plasma de teste for próxima de zero (ou seja, se a densidade óptica de todas as diluições for semelhante à do branco), podem ocorrer linhas não paralelas. A faixa normal deve ser estabelecida localmente, mas com frequência apresenta limite inferior de 50–65 UI/dL para FVIII e FIX. O CSA de FIX pode não medir com exatidão a recuperação de alguns produtos de FIX de meia-vida estendida (Gray et al, 2020; Bowyer et al, 2022). Ensaios cromogênicos podem ser usados para medir o efeito mimético em plasma que contém anticorpos biespecíficos (Jenkins et al, 2020; Bowyer et al, 2020; Bowyer et al, 2023). CSA de FVIII contendo FX bovino pode ser usado para medir a terapia com FVIII recombinante em plasma que também contém anticorpos biespecíficos. Se possível, um novo diagnóstico de hemofilia A ou B leve deve ter FVIII:C ou FIX:C também medidos por ensaio cromogênico (Bowyer et al, 2018). Deve-se ter cautela ao usar o CSA para medir o FVIII suíno recombinante, pois pode ocorrer subestimação (Bowyer et al, 2022). O CSA de FIX pode subestimar as terapias com FIX de meia-vida padrão recombinante (Nederlof et al, 2020).

Medição das moléculas de FVIII e FIX de EHL: foram feitas modificações no FVIII ou FIX recombinante para estender a meia-vida *in vivo* da terapia, alterando a conformação da molécula. A extensão pode ser feita pela adição de grupos de polietilenoglicol (PEG), ligação covalente das cadeias pesada e leve do FVIII, fusão à albumina ou fusão covalente à porção fc (fragmento cristalizável) da IgG1 humana. Monitoramento pós-infusão dos concentrados de FVIII ou FIX de EHL recombinante é necessário para o manejo clínico do paciente com hemofilia. Resposta menor do que a esperada ou meia-vida reduzida pode indicar a necessidade de terapia adicional ou possível desenvolvimento de anticorpos antidroga. Estudos laboratoriais conduzidos durante os ensaios farmacêuticos de cada EHL destacaram problemas com a medição laboratorial exata de algumas moléculas. Super ou subestimação foi relatada com alguns FVIII ou FIX de EHL, mas isso dependeu da metodologia ou do TTPA utilizado no OSA. O método de modificação molecular não é preditivo da resposta do ensaio de fator, de modo que o monitoramento exato das três moléculas de FVIII PEGilado pode não ser possível com os mesmos reagentes de TTPA. Para moléculas de FVIII de EHL atualmente licenciadas, todos os ensaios cromogênicos de atividade de FVIII são

considerados adequados para monitoramento exato, mas no caso de OSA, isso pode depender do reagente. Para moléculas de FIX de EHL, não existe uma única metodologia ou reagente de ensaio que meça com exatidão todos os três concentrados atualmente licenciados. Um concentrado de meia-vida ultralonga, rFVIII-FCVWF-XTEN, efanosoctocog alfa (Altuviiio/Altuvioct), recebeu aprovação regulatória nos EUA em 2023 e na Europa em 2024. Recomenda-se monitoramento por OSA de FVIII usando um reagente de TTPA específico, Actin FSL da Siemens. Os reagentes de TTPA prevalentes, Actin FS da Siemens e Synthasil da Werfen, superestimaram e subestimaram o efanosoctocog alfa, respectivamente. Os ensaios cromogênicos de FVIII superestimaram em 2-3 vezes a atividade esperada (Pipe, 2009). Portanto, é necessário avaliar cuidadosamente se os ensaios disponíveis em cada laboratório de hemostasia são adequados para o monitoramento exato de cada EHL usado como terapia de reposição em seu centro. As Tabelas 17 e 18 apresentam exemplos de concentrados de rFVIII e rFIX de EHL, como a potência do produto foi atribuída e se OSA ou CSA são aceitáveis para uso no monitoramento da atividade pós-infusão.

Tabela 17. Moléculas de FVIII de EHL

Nome	Empresa	Molécula	Rótulo de potência	OSA	CSA	Referências
Adynovi/ Adynovate Rurioctocog alfa pegol	Takeda	FVIII 2 x 10 kDa PEG	CSA	Resultados variados	Sim	Turecek et al, 2016 Bulla et al, 2017
Afstyla Ionoctocog alfa	CSL Behring	FVIII BDD de cadeia única	CSA	Resultados são aproxima- damente metade do CSA	CSA	Bowyer et al, 2017 St Ledger et al, 2018
Elocta/ Eloctate efmorocotocog	Sobi	Fusão FVIII FC	CSA	Sim	Sim	Sommer et al, 2014 Powell et al, 2012 Pouplard et al, 2020
Esperoct Turoctocog alfa pegol	Novo Nordisk	rFVIII truncado no BD 40 kDa PEG	CSA	Resultados variados	Sim	Pickering et al, 2016 Hillarp et al, 2017
Jivi Damocotocog alfa pegol	Bayer	rFVIII BDD 60 kDa PEG	CSA	Não reagentes de TTPA de sílica ou caulim	Sim	Gu et al, 2014 Church et al, 2018
Altuvioct/ Altuviio Efanosoctocog alfa	Sanofi	rFVIII FC- VWF-XTEN	OSA	Actin FSL recomendado	Superestima 2-3 vezes	Pipi et al, 2024

Tabela 18. Moléculas de FIX de EHL

Nome	Empresa	Molécula	Rótulo de potência	OSA	CSA	Referências
Alprolix etrenonacog	Sobi	Fusão rFIX FC	OSA	Não alguns reagentes de TTPA de sílica ou caulim	Sim	Sommer et al, 2014 Bowyer et al, 2019 Persson et al, 2018
Idelvion albutrepenonacog	CSL Behring	Fusão rFIX albumina	OSA	Resultados variados	Não	Persson et al, 2018 St Ledger et al, 2016 Kitchen et al, 2017 Horn et al, 2019 Pouplard et al, 2019
Refixia/Rebinyon Nonacog beta pegol	Novo Nordisk	rFIX 40 kDa PEG	OSA	Apenas Cephascree e Synthafax validados	Sim	Bowyer et al, 2016 Tiefenbacher et al, 2017 Young et al, 2016

Anticorpos Biespecíficos:

Medição de anticorpos biespecíficos: os anticorpos biespecíficos são uma classe de terapia de não reposição para hemofilia A. Eles agem como ponte entre o FIXa humano e o FX humano, na ausência de FVIII, promovendo a ativação de FX. Os anticorpos biespecíficos diferem do FVIII original em vários aspectos intrínsecos, incluindo a ausência de mecanismos regulatórios, o que impacta os ensaios de hemostasia (Lenting et al, 2017). Gerações futuras e mais potentes de anticorpos biespecíficos podem ter um impacto maior nos testes de hemostasia (Bowyer et al, 2023).

TTPA e anticorpos biespecíficos: anticorpos biespecíficos não requerem ativação para participar da ativação de FX. Na presença de anticorpos biespecíficos, o TTPA é drasticamente reduzido, frequentemente abaixo do limite inferior da faixa de referência (Bowyer et al, 2020; Bowyer et al, 2023). O TTPA não é sensível o suficiente a alterações na concentração de anticorpos biespecíficos para ser usado no monitoramento dessas terapias; no entanto, prolongamento do TTPA em um paciente com TTPA anteriormente curto pode indicar perda de eficácia ou adesão (Druzgal et al, 2020; Valsecchi et al, 2021).

OSA e anticorpos biespecíficos: na presença de anticorpos biespecíficos, ensaios padrão, calibrados com plasma e baseados em TTPA, incluindo FVIII, FIX, FXI, XII, proteína C, proteína S e tempo de coagulação ativada (TCA), superestimam a quantidade de fator de coagulação ou inibidor natural, sendo, portanto, inadequados para uso (Bowyer et al, 2023; EMA, 2018).

OSA de FVIII modificado e anticorpos biespecíficos: calibradores comerciais específicos para o produto (padrão/referência) e plasmas de controle de qualidade estão disponíveis para a primeira geração de anticorpos biespecíficos. O ensaio de FVIII de um estágio pode ser modificado usando esses calibradores específicos para o produto juntamente com maior diluição do plasma (diluições de 1/40 ou 1/80 em vez de 1/10) para medir a concentração do fármaco no anticorpo biespecífico em µg/mL. Esse ensaio modificado também medirá qualquer FVIII endógeno ou de reposição presente no plasma (Bowyer et al, 2020).

FVIII cromogênico e anticorpos biespecíficos: CSA de FVIII que contém FX e FIXa humanos são sensíveis à presença de anticorpos biespecíficos e medem alguma atividade de FVIII semelhante “mimética ou substituta” (Bowyer et al, 2020; Bowyer et al, 2023). CSA humano pode ser usado como marcador da presença de anticorpos biespecíficos em pacientes que recebem profilaxia. Isso não é intercambiável com o nível de concentração do fármaco detalhado acima. O CSA humano também medirá qualquer FVIII endógeno ou de reposição presente no plasma (Bowyer et al, 2020). CSA de FVIII que contém FX bovino e FIXa humano ou bovino são insensíveis à presença de anticorpos biespecíficos de primeira geração, mas podem demonstrar alguma sensibilidade a anticorpos biespecíficos de próxima geração (Bowyer et al, 2020; Bowyer et al, 2023). CSA de FX bovino deve ser usado para medir qualquer

FVIII endógeno ou terapia de reposição de FVIII e para medir o FVIII residual no ensaio de inibidor de Bethesda, conforme detalhado abaixo.

Ensaio de inibidor de Bethesda e anticorpos biespecíficos: a medição de FVIII residual após incubação nos ensaios de inibidor de Bethesda geralmente é feita por OSA (Verbruggen B, 1995), embora medições cromogênicas e fluorogênicas tenham sido validadas (Miller et al, 2021). Na presença de anticorpos biespecíficos, OSA não pode ser utilizado, portanto, CSA deve ser usado. É importante que o kit de CSA utilizado contenha FX bovino e FIXa humano ou bovino para excluir o efeito do anticorpo biespecífico, caso contrário, o título do inibidor será subestimado (Bowyer et al, 2021; Miller et al, 2021).

Monitoramento Pós-Infusão de FVIII e FIX: o monitoramento pós-infusão de concentrados de FVIII ou FIX, derivados de plasma ou recombinantes, de meia-vida padrão é necessário para o manejo clínico do paciente com hemofilia. Resposta menor do que a esperada ou meia-vida reduzida pode indicar a necessidade de terapia adicional ou possível desenvolvimento de inibidores. A medição da terapia de reposição deve, idealmente, ser realizada com o mesmo método e mesmos reagentes de ensaio que foram originalmente utilizados para atribuir a potência ao produto. Caso isso não seja possível, deve-se utilizar um ensaio alternativo validado. Na Europa, a rotulagem de potência para concentrados de FVIII é feita por CSA (Barrowcliffe et al, 2002) e para concentrados de FIX é feita por OSA (Kitchen et al, 2016). A *Food and Drug Administration* (FDA, 2020) [Agência de Controle de Alimentos e Medicamentos] dos Estados Unidos recomenda o uso de OSA para concentrados de FIX, porém alguns concentrados de FVIII têm potência atribuída por OSA e outros por CSA. A WFH recomenda o uso de um ensaio de FVIII ou FIX validado para uso com o concentrado específico utilizado no tratamento e calibrado com um padrão de plasma rastreável em relação ao padrão internacional vigente da OMS (Srivastava et al, 2020). Outras diretrizes recomendam o uso de OSA ou CSA calibrados com padrões de plasma para monitorar concentrados de FVIII derivados de plasma, a menos que haja evidências em contrário, e o uso de um OSA para concentrados de FIX (Gray et al, 2020). As Tabelas 19 e 20 apresentam exemplos de concentrados de FVIII e FIX derivados de plasma e recombinantes de meia-vida padrão comumente disponíveis, como a potência do produto foi atribuída e se OSA ou CSA são aceitáveis para uso no monitoramento da atividade pós-infusão.

Tabela 19. Exemplos de concentrados derivados de plasma

Concentrado	Fator	Atribuição de potência	CSA	OSA	Referências
Factane	VIII	CSA	Sim	Sim	Adcock et al, 2018
Octanate	VIII	CSA	Sim	Sim	
FVIII 8Y	VIII	CSA	Sim	Sim	
Haemoctin	VIII	CSA	Sim	Sim	
Octaplex	VIII	CSA	Sim	Sim	
Recombinate	VIII	CSA	Sim	Sim	Jennings et al, 2007
Fanhdi	VIII	CSA	Sim	Sim	Peyvandi et al, 2016
Hemofil M	VIII	CSA	Sim	Sim	Peyvandi et al, 2016
Emoclot	VIII	CSA	Sim	Sim	Peyvandi et al, 2016
Replenine	IX	OSA		Sim	
Betafact	IX	OSA Pathromtin SL (sílica)	Provavelmente aceitável	Sim	Adcock et al, 2018
Mononine	IX	OSA Pathromtin SL (sílica)	Sim	Sim	Bowyer et al, 2016 Wilmot et al, 2014
Octafix	IX	OSA Pathromtin SL (caulim)	Sem dados	Sim	
Alphanine	IX	OSA		Sim	Aznar et al, 2009

Tabela 20. Exemplos de concentrados recombinantes de meia-vida padrão

Concentrado	Fator	Atribuição de potência	CSA	OSA	Referências
Advate	FVIII - comprimento total	CSA	Sim	Sim	Kitchen et al, 2016 Kitchen et al, 2019
Refacto AF	FVIII-BDD	CSA	Sim	Sim, com padrão lab Refacto	Kitchen et al, 2016 Morfini et al, 2003 Ingerslev et al, 2004
Novo8	FVIII-BDD	CSA	Sim	Sim, mas alguma superestimação nos níveis mínimos	EMA, 2021 Viuff et al, 2011
Nuwiq	FVIII-BDD	CSA	Sim	Sim	Lissitchkov et al, 2016 EMA, 2022 Klukowska et al, 2016 Tiefenbacher et al, 2019
Xyntha	FVIII-BDD	OSA	Não - superestimação	Sim	FDA, 2020
Kovaltry	FVIII	CSA	Sim	Sim	Mahlangu et al, 2018 Kitchen et al, 2016
Benefix	IX	OSA	Dados insuficientes	Sim	Bowyer et al, 2016 Kershaw et al, 2018 Sommer et al, 2014
Rixubis	IX	OSA Pathromtin SL validado	Sim	Sim	Kershaw et al, 2018 Gritsch et al, 2014

Terapia Gênica: hemofilia A e B são doenças monogênicas e, portanto, candidatas ideais para manipulação genética. Uma gama variada de estratégias de terapia gênica, incluindo edição genética, tem sido pesquisada em humanos para as duas doenças desde o início dos anos 2000 (De Wolf et al, 2023). Em meados da década de 2020, aprovação regulatória foi concedida em alguns países para o uso limitado de produtos de terapia gênica no tratamento de pessoas com hemofilia A ou B. A medição da expressão do transgene FVIII ou FIX é essencial para determinar a duração da resposta e se terapias adicionais são necessárias para obter hemostasia. Para minimizar a variabilidade interlaboratorial, é sensato restringir o monitoramento de rotina a um número limitado de laboratórios especializados em hemostasia em cada país. Estudos clínicos de diversas terapias gênicas relataram variabilidade nos ensaios, com atividades cromogênicas de FVIII e FIX 1,5 a 3,0 vezes menores do que as atividades de um estágio. Diferenças foram relatadas entre reagentes no mesmo método de ensaio. Em razão das restrições de volume de plasma adequado, é difícil conduzir estudos multicêntricos de comparação de laboratórios em amostras de pacientes que receberam terapia gênica. Entretanto, foram disponibilizados dados limitados sobre a medição das moléculas candidatas de FVIII ou FIX utilizando uma variedade de métodos ou reagentes. Sempre que possível, para minimizar a variabilidade, os reagentes e métodos usados nos estudos clínicos farmacêuticos devem ser utilizados pelos laboratórios para monitorar a expressão pós-terapia gênica (Tabela 21).

Tabela 21. Terapia gênica para hemofilia A e B

	Farmacêutica	Nome comercial	Método de ensaio	Reagentes
Hemofilia A				
Valoctocogene roxaparvovec	Biomarin	Roctavian	CSA	Coatest SP4
Hemofilia B				
Etranacogene dezaparvovec	CSL Behring	Hemgenix	OSA	Synthasil
Fidanacogene elaparvovec	Pfizer	Beqvez	OSA	Synthasil

Terapia gênica para hemofilia A: todas as abordagens para hemofilia A usaram vetores AAV e FVIII recombinante com domínio B deletado (BDD). Estudos de Fase 1–3 do Roctavian (AAV5-FVIII-SQ, Valoctocogene roxaparvovec, Biomarin) mediram o transgene FVIII:C por CSA com Coatest SP4 e OSA usando o reagente para TTPA Actin FSL da Siemens no analisador BCS XP da Siemens (Rangarajan et al, 2017). O FVIII:C no CSA foi aproximadamente metade do FVIII:C no OSA (Mahlangu et al, 2023). Rosen et al relataram resultados comparáveis entre CSA com Coatest SP4 e da Hyphen Biomed ao medir AAV5-FVIII-SQ (4). Uma comparação entre dois centros de FVIII:C medido por OSA ou CSA no plasma de pacientes após terapia com Roctavian relatou uma diferença aproximada de 1,65 vezes entre OSA e CSA. Resultados semelhantes de FVIII:C foram obtidos com o CSA da Hyphen Biomed e dois outros CSA (Platton et al, 2024). Os autores concluíram que os OSA não eram adequados para medição de FVIII após terapia gênica com Roctavian, e apenas CSA deveria ser usado.

Terapia gênica para hemofilia B: os dois produtos para hemofilia B atualmente aprovados, Hemgenix (Etranacogene dezaparvovec, CSL Behring) e Beqvez (Fidanacogene elaparvovec, Pfizer), usam uma variante de FIX altamente ativa e de ocorrência natural, FIX-Padua (R338L) (Simioni et al, 2009). Programas farmacêuticos relataram atividade de FIX apenas por OSA em seus relatórios de estudo. Variabilidade entre reagentes e metodologias foi relatada ao medir FIX-Padua após expressão gênica e em plasma enriquecido com a molécula de FIX-Padua. Um estudo de campo global de plasma enriquecido com uma molécula de R338L recombinante (FLT180a, verbrinacogene setparvovec, pela Freeline Therapeutics, que está atualmente pausado no final dos testes de fase 1/2) relatou uma diferença de 3 vezes na atividade de FIX entre 15 OSA e CSA diferentes. Variação de 1,8 vezes foi observada entre 13 reagentes de TTPA no OSA, enquanto os resultados de ambos os CSA foram aproximadamente metade da atividade esperada medida por OSA com Synthasil (Foley et al, 2023). A medição da atividade do transgene FIX-Padua Beqvez destacou diferenças de ensaio entre cinco reagentes de TTPA no OSA entre OSA e CSA (Robinson et al, 2021). Em um estudo de campo global que usou plasma de participantes do estudo de Fase 1/2a de terapia gênica, FIX:C foi mais alto com o reagente de TTPA ativado por sílica, Synthasil, no OSA do que com os reagentes de TTPA ativados por ácido elágico, Actin FS e Actin FSL, ou CSA (Pittman et al, 2024). Foram disponibilizados dados laboratoriais mínimos sobre a medição da atividade de FIX após terapia gênica com Hemgenix. O Resumo das Características do Produto afirma que a atividade de FIX é menor por CSA do que OSA (EMA, 2024). Estudos clínicos de Fase 1–3 de FIX usaram o reagente de TTPA Synthasil no OSA e um CSA não divulgado; as atividades de FIX por OSA foram pelo menos duas vezes maiores do que com CSA (Pipe et al, 2023; Miesbach et al, 2018).

Aspectos Laboratoriais para Tratamento com Terapia de Reequilíbrio da Hemostasia: as terapias de não reposição de fator para hemofilia A ou B visam promover a coagulação e reequilibrar a hemostasia, tendo como alvo anticoagulantes ou inibidores naturais da coagulação, incluindo antitrombina, inibidor da via do fator tecidual (TFPI), proteína C ou proteína S (Nogami and Shima, 2023). Algumas dessas terapias foram aprovadas para uso em determinados grupos de pacientes, outras estão atualmente em estudos farmacêuticos.

Moléculas que têm como alvo a antitrombina: a antitrombina (AT) ativada por heparina exerce ações inibitórias sobre a trombina, FXa, FIXa, FXIa e FXIIa (Rezaie et al, 2020). Uma pequena molécula de RNA interferente, o fitusiran, que tem como alvo a síntese de AT nos hepatócitos, foi desenvolvida para melhorar a geração de trombina (Young et al, 2023). Em estudos clínicos, redução de 82–87% na AT foi associada a aumento da geração de trombina (Pasi et al, 2021). Os níveis alvo de atividade de AT são de 15–35 UI/dL. Os ensaios de AT estão bem estabelecidos como

parte dos testes de trombofilia, mas é raro medir atividades de AT tão baixas. Um estudo de campo comparativo global de laboratórios que avaliou a medição de uma série de atividades de AT (9–100 UI/dL) concluiu que alguns ensaios de AT não devem ser usados para monitorar a AT durante o tratamento com fitusiran (Chhabra et al, 2024).

Moléculas que têm como alvo o TFPI: os anticorpos anti-TFPI têm como alvo o domínio Kunitz 2 do TFPI e impedem a ligação ao FX ativado, permitindo assim a continuidade da geração de FXa (Mast et al, 2022). O primeiro anticorpo monoclonal anti-TFPI (concizumabe, Novo Nordisk, Dinamarca) foi aprovado para uso em 2023 em pacientes canadenses com hemofilia B com inibidores. Um anticorpo anti-TFPI alternativo, o marstacimabe (Pfizer, EUA), está sendo considerado para aprovação nos EUA e na Europa para pessoas com hemofilia A ou B sem inibidores (Matino et al, 2023). Ensaios de TFPI estão disponíveis em alguns laboratórios de pesquisa ou especializados, mas a utilidade clínica da medição não é clara.

Moléculas que têm como alvo a proteína C ativada (APC): a APC, em conjunto com o cofator proteína S, inativa o FVa e o FVIIIa para impedir a geração adicional de trombina. FV Leiden é uma mutação p.Arg506Gln (c.1691G>A) no sítio primário de clivagem da APC no FV ativado. A presença de FV Leiden retarda a inativação de FVa pela APC e é a causa mais comum de trombofilia em humanos (Van Cott et al, 2016). Abordagens alternativas que visam a APC estão sendo investigadas em estudos clínicos. Foi relatado que um anticorpo monoclonal humanizado que inibe a proteína C ativada restabelece a hemostasia em camundongos hemofílicos (Jiang et al, 2023), e foram iniciados estudos em humanos de um inibidor de serina protease (serpina) que tem como alvo apenas a APC, e não a proteína C precursora (Baglin et al, 2023). Ensaios de proteína C e APC estão disponíveis rotineiramente em muitos laboratórios terciários de hemostasia, caso seja necessária a medição para o monitoramento de medicamentos.

Moléculas que têm como alvo a proteína S: a proteína S é um cofator para TFPI e APC que agem restringindo a geração de trombina. Foi relatado que o uso de um pequeno RNA interferente que tem como alvo a proteína S melhora a hemostasia em camundongos com hemofilia (Prince et al, 2020), e um anticorpo contra a proteína S tem sido usado para potencializar a terapia de reposição de FIX na geração de trombina em pacientes com hemofilia B (Wilson et al, 2024). Proteína S livre e proteína S total, que também medem a proteína S complexada com o regulador do complemento, proteína de ligação C4b, estão rotineiramente disponíveis em muitos laboratórios terciários de hemostasia, caso seja necessária a medição para o monitoramento de medicamentos.

Ensaios de geração de trombina: os ensaios de geração de trombina (TG) são ensaios globais que conseguem avaliar o potencial hemostático geral e destacar hiper ou hipocoagulabilidade no plasma (Ninivaggi et al, 2021). Existem diversos ensaios cromogênicos ou fluorogênicos de TG, internos e comerciais, que comumente desencadeiam a TG usando fator tecidual, FXIa ou FIXa. Em razão da falta de padronização, há baixa correlação entre eles (Devreese et al, 2007). Apesar dessas questões, ensaios de TG são frequentemente utilizados em estudos farmacêuticos para avaliar o efeito de novas moléculas na hemostasia.

Referências

- Adcock DM, Strandberg K, Shima M, Marlar RA. Advantages, disadvantages and optimization of one-stage and chromogenic factor activity assays in haemophilia A and B. *Int J Lab Hematol* 2018; 40(6): 621-629.
- Aznar JA, Cabrera N, Matysiak M, Zawilska K, Gercheva L, Antonov A, Montañés M, Páez AM, Lissitchkov T. Pharmacokinetic study of a high-purity factor IX concentrate (factor IX Grifols) with a 6-month follow up in previously treated patients with severe haemophilia b. *Haemophilia* 2009; 15(6): 1243-1248.
- Baglin T, Huntington JA, Koch A, Mocanu I, Makhaldiani L. Serpin-PC in persons with severe hemophilia (PwH): Updated results from a multicenter multi-part, first-in-human study. *Blood* 2023; 142(Supplement 1) :2619.
- Baker P, Platton S, Gibson C, Gray E, Jennings I, Murphy P, Laffan M. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Br J Haematol* 2020; 191(3): 347-362.
- Barrowcliffe TW, Raut S, Sands D, Hubbard AR. Coagulation and chromogenic assays of factor VIII activity: General aspects, standardization, and recommendations. *Semin Thromb Hemost* 2002; 28(3): 247-256.

- Bowyer A, Gray E, Lowe A, Murphy P, Platton S, Riddell A, Chowdary P, Lester W, Jenkins PV. Laboratory coagulation tests and recombinant porcine factor VIII: A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation guideline. *Haemophilia* 2022; 28(3): 515-519.
- Bowyer A, Kitchen S, Maclean R. Effects of emicizumab on APTT, one-stage and chromogenic assays of factor VIII in artificially spiked plasma and in samples from haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia* 2020; 26(3): 536-542.
- Bowyer A, Kitchen S, Maclean R. Measurement of antifactor VIII antibody titre in the presence of emicizumab; Use of chromogenic Bethesda assays. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(4): O204-O206.
- Bowyer AE, Duncan EM, Antovic JP. Role of chromogenic assays in haemophilia A and B diagnosis. *Haemophilia* 2018; 24(4): 578-583.
- Bowyer AE, Ezban M, Kitchen S. Measuring the FVIII mimetic activity of the new bispecific antibody, Mim8, in severe haemophilia A plasma using APTT and one-stage FVIII assays. *Res Pract Thromb Haemost* 2021; 5: Abstract PB0680.
- Bowyer AE, Goodeve AC, Liesner R, Mumford AD, Kitchen S, Makris M. p.Tyr365Cys change in factor VIII: haemophilia A, but not as we know it. *Br J Haem* 2011; 154(5): 618-625.
- Bowyer AE, Gosselin RC. Factor VIII and factor IX activity measurements for hemophilia diagnosis and related treatments. *Semin Thromb Hemost* 2022; 49(06): 609-620.
- Bowyer AE, Hillarp A, Ezban M, Persson P, Kitchen S. Measuring factor IX activity of nonacog beta pegol with commercially available one-stage clotting and chromogenic assay kits: A two-center study. *J Thromb Haemost* 2016; 14(7): 1428-1435.
- Bowyer AE, Kitchen S, Ezban M. The effect of a next generation factor VIII mimetic bispecific antibody (Mim8) on assays of factor VIII activity and thrombin generation. *J Thromb Haemost* 2023; 21(3): 480-487.
- Bowyer AE, Kitchen S, Maclean RM. Effects of emicizumab on APTT, one-stage and chromogenic assays of factor VIII in artificially spiked plasma and in samples from haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia* 2020; 26(3): 536-542.
- Chhabra ES, Sadeghi-Khomami A, Liu M, Young G, Pipe SW, Ozelo MC, Le-Camus C, Toh M, Lima-Montalvo SA, Demissie M. Global comparative antithrombin (AT) field study: Impact of laboratory assay variability on the assessment of AT activity measurement (abstract PP-072). *Haemophilia* 2024; 30: 3-223.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Determination of coagulation factor activities using the one-stage clotting assay, 2nd edition. CLSI standard H48. 2016. <https://clsi.org/standards/products/hematology/documents/h48/>.
- De Wolf D, Singh K, Chuah MK, VandenDriessche T. Hemophilia gene therapy: The end of the beginning? *Hum Gene Ther* 2023; 34(17-18): 782-792.
- Devreese K, Wijns W, Combes I, Van kerckhoven S, Hoylaerts MF. Thrombin generation in plasma of healthy adults and children: chromogenic versus fluorogenic thrombogram analysis. *Thromb Haemost* 2007; 98(3): 600-613.
- Druzgal CH, Kizilacak H, Brown J, Sennett M, Young G. Neutralizing antidrug antibody to emicizumab in a patient with severe hemophilia A with inhibitors: New case with detailed laboratory evaluation. *J Thromb Haemost* 2020; 18(9): 2205-2208.
- European Medicines Agency (EMA). Hemlibra (emicizumab) Summary of Product Characteristics. 2018. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/hemlibra-epar-product-information_en.pdf.
- European Medicines Agency (EMA). NovoEight (turoctocog alfa) Summary of Product Characteristics. 2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/novoeight-epar-product-information_en.pdf.
- European Medicines Agency (EMA). Hemgenix (etranacogene dezaparvovec) Summary of Product Characteristics. 2024. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/hemgenix-epar-product-information_en.pdf.
- European Medicines Agency (EMA). Nuwiq (simoctocog alfa) Summary of Product Characteristics. 2022. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/nuwiq-epar-product-information_en.pdf.
- Foley JH, Shehu E, Riddell A, Gray E, Goodale A, Yu IM et al. Differences in wild-type- and R338L-tenase complex formation are at the root of R338L-factor IX assay discrepancies. *Blood Adv* 2023; 7(3): 458-467.
- Food and Drug Administration (FDA). Xyntha (antihemophilic factor [recombinant]) Prescribing Information. 2020. <https://www.fda.gov/media/70399/download>.

Gray E, Kitchen S, Bowyer AE, Chowdary P, Jenkins PV, Murphy P et al. Laboratory measurement of factor replacement therapies in the treatment of congenital haemophilia: A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation guideline. *Haemophilia* 2020; 26(1): 6-16.

Gritsch H, Romeda-Finger S, Scheiflinger F, Turecek PL. Potency assignment and measurement of recombinant FIX activity in human plasma – impact of aPTT reagents on the 1-stage clotting assay. *Haemophilia* 2014; 20(s3): 37 (abstract).

Ingerslev J, Jankowski MA, Weston SB, Charles LA. Collaborative field study on the utility of a BDD factor VIII concentrate standard in the estimation of BDDr factor VIII:C activity in hemophilic plasma using one-stage clotting assays. *J Thromb Haemost* 2004; 2(4): 623-628.

Jenkins PV, Bowyer AE, Burgess C, Gray E, Kitchen S, Murphy P et al. Laboratory coagulation tests and emicizumab treatment A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation guideline. *Haemophilia* 2020; 26: 151-155.

Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, Kitchen S, Walker ID. Emerging technologies and quality assurance: the United Kingdom National External Quality Assessment Scheme perspective. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33(3): 243-249.

Jiang M, Yang F, Jiang Y, Cheng L, Han J, Yi J et al. Safety and efficacy of an anti-human APC antibody for prophylaxis of congenital factor deficiencies in preclinical models. *Blood* 2023; 142(12): 1071-1081.

Kershaw GW, Dissanayake K, Chen VM, Khoo T. Evaluation of chromogenic FIX assays by automated protocols. *Haemophilia* 2018; 24(3): 492-501.

Kitchen S, Beckmann H, Katterle Y, Bruns S, Tseneklidou-Stoeter D, Maas Enriquez M. BAY 81-8973, a full-length recombinant factor VIII: results from an International comparative laboratory field study. *Haemophilia* 2016; 22(3): e192-e199.

Kitchen S, Jennings I, Makris M, Kitchen DP, Woods TAL, Walker ID. Clotting and chromogenic factor VIII assay variability in post-infusion and spiked samples containing full-length recombinant FVIII or recombinant factor VIII Fc fusion protein (rFVIII-Fc). *Int J Lab Hematol* 2019; 41(2): 176-183.

Kitchen S, Jennings I, Makris M, Kitchen DP, Woods TAL, Walker ID. Factor VIII assay variability in postinfusion samples containing full length and B-domain deleted FVIII. *Haemophilia* 2016; 22(5): 806-812.

Kitchen S, Katterle Y, Beckmann H, Maas Enriquez M. Chromogenic assay for BAY 81-8973 potency assignment has no impact on clinical outcome or monitoring in patient samples. *J Thromb Haemost* 2016; 14(6): 1192-1199.

Kitchen S, Kershaw GW, Tiefenbacher S. Recombinant to modified factor VIII and factor IX – chromogenic and one-stage assay issues. *Haemophilia* 2016; 22: 72-77.

Klukowska A, Szczepański T, Vdovin V, Knaub S, Jansen M, Liesner R. Novel, human cell line-derived recombinant factor VIII (Human-cl rhFVIII, Nuwiq®) in children with severe haemophilia A: efficacy, safety and pharmacokinetics. *Haemophilia* 2016; 22(2): 232-239.

Lenting PJ, Denis CV, Christophe OD. Emicizumab, a bispecific antibody recognising coagulation factors IX and X: how does it actually compare to factor VIII? *Blood* 2017; 130: 2463-2468.

Lissitchkov T, Hampton K, von Depka M, Hay C, Rangarajan S, Tuddenham E et al. Novel, human cell line-derived recombinant factor VIII (human-cl rhFVIII; Nuwiq®) in adults with severe haemophilia A: efficacy and safety. *Haemophilia* 2016; 22(2): 225-231.

Mahlangu J, Kaczmarek R, von Drygalski A, Shapiro S, Chou S, Ozelo MC et al. Two-year outcomes of valoctocogene roxaparvovec therapy for hemophilia A. *New Eng J Med* 2023; 388(8): 694-705.

Mahlangu JN, Ahuja SP, Windyga J, Church N, Shah A, Schwartz L. BAY 81-8973, a full-length recombinant factor VIII for the treatment of hemophilia A: product review. *Ther Adv Hematol* 2018; 9(7): 191-205.

Mast AE, Ruf W. Regulation of coagulation by tissue factor pathway inhibitor: Implications for hemophilia therapy. *J Thromb Haemost* 2022; 20(6): 1290-1300.

Matino D, Acharya S, Palladino A, Hwang E, McDonald R, Taylor CT et al. Efficacy and safety of the anti-tissue factor pathway inhibitor marstacimab in participants with severe hemophilia without inhibitors: Results from the phase 3 Basis trial. *Blood* 2023; 142(Supplement 1): 285.

- Miesbach W, Meijer K, Coppens M, Kampmann P, Klamroth R, Schutgens R et al. Gene therapy with adeno-associated virus vector 5-human factor IX in adults with hemophilia B. *Blood* 2018;131(9):1022-31.
- Miller CH, Boylan B, Payne AB, Driggers J, Bean CJ. Validation of the chromogenic Bethesda assay for factor VIII inhibitors in hemophilia A patients receiving Emicizumab. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(2): e84-e86.
- Miller CH, Rice AS, Boylan B, Shapiro AD, Lentz SR, Wicklund BM et al. Comparison of clot-based, chromogenic, and fluorescence assays for measurement of factor VIII inhibitors in the U.S. Hemophilia Inhibitor Research Study. *J Thromb Haemost* 2013; 11(7): 1300-1309.
- Morfini M, Cinotti S, Bellatreccia A, Paladino E, Gringeri A, Mannucci PM. A multicenter pharmacokinetic study of the B-domain deleted recombinant factor VIII concentrate using different assays and standards. *J Thromb Haemost* 2003; 1(11): 2283-2289.
- Moser KA, Smock KJ. Direct oral anticoagulant (DOAC) interference in hemostasis assays. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2021; 2021(1): 129-133.
- Nederlof A, Kitchen S, Meijer P, Cnossen MH, Ali Pour N, Kershaw GW et al. Performance of factor IX extended half-life product measurements in external quality control assessment programs. *J Thromb Haemost* 2020; 18: 1874-1883.
- Ninivaggi M, de Laat-Kremers R, Tripodi A, Wahl D, Zuily S, Dargaud Y et al. Recommendations for the measurement of thrombin generation: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibodies. *J Thromb Haemost* 2021; 19(5): 1372-1378.
- Nogami K, Shima M. Current and future therapies for haemophilia—Beyond factor replacement therapies. *Br J Haematol* 2023; 200(1): 23-34.
- Pasi KJ, Lissitchkov T, Mamonov V, Mant T, Timofeeva M, Bagot C et al. Targeting of antithrombin in hemophilia A or B with investigational siRNA therapeutic fitusiran-Results of the phase 1 inhibitor cohort. *J Thromb Haemost* 2021; 19(6): 1436-1446.
- Pavlova A, Delev D, Pezeshkpoor B, Muller J, Oldenburg J. Haemophilia A mutations in patients with non-severe phenotype associated with a discrepancy between one-stage and chromogenic factor VIII activity assays. *Thromb Haemost* 2014; 111(5): 851-861.
- Peyvandi F, Oldenburg J, Friedman KD. A critical appraisal of one-stage and chromogenic assays of factor VIII activity. *J Thromb Haemost* 2016; 14(2): 248-261.
- Pipe SW, Leebeek FW, Recht M, Key NS, Castaman G, Miesbach W et al. Gene therapy with etranacogene dezaparvovec for hemophilia B. *New Engl J Med* 2023; 388(8): 706-718.
- Pipe SW, Sadeghi-Khomami A, Konkle BA, Kitchen S, Negrier C, Liu M, et al. A global comparative field study to evaluate the factor VIII activity of efanesoctocog alfa by one-stage clotting and chromogenic substrate assays at clinical haemostasis laboratories. *Haemophilia*. 2024;30(1):214-23.
- Pittman DD, Carrier C, Soares H, McKay J, Tan CY, Liang JZ et al. Field study and correlative studies of factor IX variant FIX-R338L in participants treated with fidanacogene elaparvovec. *Thromb Haemost* 2024; 124(10): 912-921.
- Platton S, Raheja P, Dale C, Guy S, Yartey N, Bowyer A. Evaluation of one-stage and chromogenic assays for the laboratory measurement of factor VIII activity following valoctocogene roxaparvovec infusion. *Haemophilia* 2024; 30(5): 1221-1224.
- Pouplard C, Trossaert M, A LEQ, Delahousse B, Giraudeau B, Gruel Y. Influence of source of phospholipids for APTT-based factor IX assays and potential consequences for the diagnosis of mild haemophilia B. *Haemophilia* 2009; 15(1): 365-368.
- Prince RE, Schaeper U, Dames S, Calzavarini S, Quarroz C, Reina Caro MD et al. Targeting protein S using small interfering RNA is well tolerated and protects mice with hemophilia A from acute hemarthrosis. *Blood* 2020; 136(Supplement 1): 20-21.
- Rangarajan S, Walsh L, Lester W, Perry DJ, Madan B, Laffan M. AAV5-factor VIII gene transfer in severe hemophilia A. *N Engl J Med* 2017; 377(26): 2519-2530.
- Rezaie AR, Giri H. Anticoagulant and signaling functions of antithrombin. *J Thromb Haemost* 2020; 18(12): 3142-3153.

Robinson M, George L, Carr ME, Samuelson-Jones BJ, Arruda VR, Murphy JE et al. Factor IX assay discrepancies in the setting of liver gene therapy using a hyperfunctional variant factor IX-Padua. *J Thromb Haemost* 2021; 19(5):1212-1218.

Rosen S, Tiefenbacher S, Robinson M, Huang M, Srimani J, Mackenzie D et al. Activity of transgene-produced B-domain-deleted factor VIII in human plasma following AAV5 gene therapy. *Blood* 2020; 136(22): 2524-2534.

Rosen S. Assay of factor VIII:C with a chromogenic substrate. *Scand J Haematol* 1984; 33(suppl 40): 139-145.

Ruinemans-Koerts J, Peterse-Stienissen I, Verbruggen B. Non-parallelism in the one-stage coagulation factor assay is a phenomenon of lupus anticoagulants and not of individual factor inhibitors. *Thromb Haemost* 2010; 104(5): 1080-1082.

Simioni P, Tormene D, Tognin G, Gavasso S, Bulato C, Iacobelli NP et al. X-linked thrombophilia with a mutant factor IX (factor IX Padua). *N Engl J Med* 2009; 361: 1671-1675.

Sommer JM, Buyue Y, Bardan S, Peters RT, Jiang H, Kamphaus GD et al. Comparative field study: impact of laboratory assay variability on the assessment of recombinant factor IX Fc fusion protein (rFIXFc) activity. *Thromb Haemost* 2014; 112(5): 932-940.

Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW et al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia* 2020; 26(suppl 6): 1-158.

Tiefenbacher S, Clausen WHO, Hansen M, Luthoft R, Ezban M. A field study evaluating the activity of N8-GP in spiked plasma samples at clinical haemostasis laboratories. *Haemophilia* 2019; 25: 893-901.

Truedsson Å, Schmidt DE, Strålfors A, Soutari N, Norberg E, Letelier A et al. One-stage versus chromogenic factor IX activity in haemophilia B [abstract]. *Res Pract Thromb Haemost* 2020;4.

Valsecchi C, Gobbi M, Beeg M, Adams T, Castaman G, Schiavone L et al. Characterization of the neutralizing anti-emizumab antibody in a patient with hemophilia A and inhibitor. *J Thromb Haemost* 2021; 19(3): 711-718.

Van Cott EM, Khor B, Zehnder JL. Factor V Leiden. *Am J Hematol* 2016; 91(1): 46-49.

Verbruggen B, Giles AR, Samis J, Verbeek K, Mensink E, Novakova I. The type of factor VIII deficient plasma used influences the performance of the Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII inhibitors. *Thromb Haemost* 2001; 86: 1435-1439.

Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. *Thromb Haemost* 1995; 72(2): 247-251.

Viuff D, Barrowcliffe TW, Saugstrup T, Ezban M, Lillicrap D. Viuff D, Barrowcliffe T, Saugstrup T, Ezban M, Lillicrap D. International comparative field study of N8 evaluating factor VIII assay performance. *Haemophilia* 2011; 17(4): 695-702.

Wilmot HV, Hogwood J, Gray E. Recombinant factor IX: discrepancies between one-stage clotting and chromogenic assays. *Haemophilia* 2014; 20(6): 981-987.

Wilson HP, Pierre A, Paysse AL, Kumar N, Cooley BC, Rudra P et al. Protein S antibody as an adjunct therapy for hemophilia B. *Blood Advances* 2024; 8(2): 441-452.

Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12(4): 229-236.

Young G, Lenting PJ, Croteau SE, Nolan B, Srivastava A. Antithrombin lowering in hemophilia: a closer look at fitusiran. *Res Pract Thromb Haemost* 2023; 7(4): 100179.

Zhao Y, Feng G, Feng L. Effects of pre-analytical storage time, temperature, and freeze-thaw times on coagulation factors activities in citrate-anticoagulated plasma. *Ann Transl Med* 2018; 6(23): 456.