UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

Hemofilia A: Revisão da fisiopatologia e novos tratamentos

Gabriel Seiji Nakata

Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Orientador(a):
Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo

2019

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1
2. OBJETIVO 3
3. MATERIAIS E MÉTODOS 4
3.1. Estratégias de pesquisa 4
3.2. Critérios de inclusão 4
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 5
4.1 Fisiopatologia da Hemofilia A 7
4.1.1 Processo Hemostático 7
4.1.2 Aspectos genéticos e moleculares 10
4.1.3 Diagnóstico da hemofilia A 13
4.1.3.1 Triagem do processo de coagulação 13
4.1.3.2 Triagem dos níveis de atividade de FVIIIc 14
4.1.3.3 Aspectos genéticos no diagnóstico da hemofilia A 14
4.2 Opções de tratamento da hemofilia A 14
4.2.1 FVIII Recombinante 14
4.2.2 Imunotolerância induzida 17
4.2.3 Agentes *bypassing* tradicionais 20
4.2.4 Novos Agentes *bypassing* 21
4.2.4.1 Emicizumabe (ACE910) 23
4.2.4.2 Fitusiran (ALN-AT3) 23
4.2.4.3 Concizumabe 24
4.2.5 Terapia Gênica 24
5. CONCLUSÕES 27
REFERÊNCIAS 27

LISTA DE ABREVIATURAS

AAV	Vírus adeno Associado
aPCC	Complexo Coagulante Anti-inibidor ativado
BHK	*Baby Hamster Kidney*
CD4+	*Clouster of Differention* 4
CD8+	*Clouster of Differention* 8
CHO	*Chinese Hamster Ovary*
DNAc	ácido desoxirribonucleico codificador
FII	Protrombina
FIIa	Trombina
FIXa	Fator de coagulação IX ativado
fT	Fator Tecidual
FV	Fator de coagulação V
FVII	Fator de coagulação VII
FVIIa	Fator de coagulação VII ativado
FVIIIc	Fator VII coagulante
FVIIIr	Fator VIII recombinante
FvW	Fator de von Willebrand
FXa	Fator de coagulação X ativado
FXIII	Fator de coagulação XIII
HA	Hemofilia Adquirida
HEK	*Human Embryonic Kidney*

IgG	Imunoglobulina G
ITI	Imunotolerância induzida
LV	vetor lentiviral
MHC	*Major Histocompatibility Complex*
MLPA	*Multiplex Ligation-Probe Amplification analysis*
NGS	*Next Generation Sequencing*
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
siRNA	Ácido Ribonucleico pequeno de interferência
TFPI	*Tissue Factor Pathway Inhibitor*
TP	Tempo de Pró-trombina
TTPA	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

RESUMO

NAKATA, G. S. **Hemofilia A: Revisão da fisiopatologia e novos tratamentos**. 2019. 19 f. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Palavras-chave: Hemofilia A. fisiopatologia. tratamentos. inibidores.

INTRODUÇÃO: A Hemofilia A é uma doença congênita, recessiva, ligada ao cromossomo X e atinge um indivíduo a cada cinco mil nascimentos masculinos ao ano. A gravidade doença é inversamente proporcional aos níveis de atividade do fator coagulante VIII, ou seja, quanto menor atividade do fator FVIII, mais grave é classificada a doença. A doença é caracterizada por grandes sangramentos, hematomas e hemartroses. O histórico de tratamento da doença evoluiu desde crioprecipitados, uma fração do sangue, substituído por FVIII recombinante e atualmente estão em desenvolvimento outras alternativas terapêuticas. **OBJETIVO:** O presente estudo teve como objetivo revisar a literatura para a busca de artigos científicos que apresentam relevância na compreensão da fisiopatologia, aspectos genéticos e moleculares da hemofilia A. Também teve como objetivo a análise de novos tratamentos terapêuticos descritos já estabelecidos no mercado ou em fase desenvolvimento tais como os FVIII recombinantes, imunotolerância induzida, agentes *bypassing*, anticorpos monoclonais e terapias gênicas e também descrever como esses tratamentos beneficiam clinicamente os pacientes hemofílicos. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foram utilizadas algumas bases científicas de dados como PubMed®, Web of Science®, UpToDate® e SciElo® para consulta de artigos relevantes ao tema proposto. Foram utilizadas palavras chaves na pesquisa, em português e inglês, pesquisadas juntamente ou separadas: hemofilia A", "hemofilia A adquirida", "Inibidores", "fisiopatologia", "aspectos moleculares", "tratamento", "novas terapias", "FVIII recombinante", "agentes *bypassing*", "terapia gênica", "imunotolerância", "anticoagulantes naturais". **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Foram selecionados 18 artigos para descrição da fisiopatologia da hemofilia A, aspectos moleculares e genéticos da doença seguindo os critérios de seleção. Também foram selecionados 28 artigos para descrição de novos tratamentos desenvolvidos ou em fase de desenvolvimento que apresentavam maior relevância clínica para os pacientes. Foram descritos diferentes aspectos da fisiopatologia da hemofilia A, tais como, processo fisiológico da hemostasia, detalhamento genético e molecular e também diagnóstico da doença. Para a descrição das alternativas terapêuticas, foram selecionadas cinco opções de tratamentos: FVIII recombinantes, agentes *bypassing* tradicionais, novos agentes *bypassing*, imunotolerância induzida e Terapia Gênica. **CONCLUSÃO:** A revisão da literatura para descrição da fisiopatologia da doença e também de novos tratamentos possibilitou a compreensão aprofundada da hemofilia. O avanço da ciência e da tecnologia permitiu que novas opções de tratamento fossem desenvolvidas, trazendo desta forma, maior eficácia clínica e segurança aos pacientes.

1. INTRODUÇÃO

A hemofilia A é uma doença hemorrágica, hereditária, de caráter recessivo e ligado ao cromossomo X, que acomete a atividade do fator VIII coagulante (FVIIIc) (OLDENBURG,J.; PEZESHKPOOR, B.; PAVLOVA, A., 2014).

Esta doença tem incidência de 1 a cada 5000 nascimentos/ano masculinos, não tendo predileção étnica ou geográfica (BALKARANSINGH; YOUNG, 2017). Na hemofilia, as mutações de novo, modificações genéticas não herdadas, afetam o gene a síntese de FVIII. A incidência de mutações de novo é de 30% para famílias sem histórico da doença e de 50% com histórico de hemofilia A. (LEUER et al., 2001; LU et al., 2017).

A doença é classificada por sua gravidade, ou seja, segundo a atividade do FVIIIc. Na hemofilia grave, a presença de FVIII é de 1% ou menos, para moderada esse valor é de 2 a 5% e para branda de 6% a 40% (FRANCHINI; MANNUCCI, 2012).

Embora a maioria dos casos de hemofilia A seja congênita, existe também a forma adquirida, chamada Hemofilia Adquirida (HA). Majoritariamente a HA está relacionada a doenças autoimunes como lúpus, artrite reumatoide, esclerose múltipla, Síndrome de Sjögern, cânceres e outras (SAKURAI; TAKEDA, 2014). Entretanto, em aproximadamente 50% dos pacientes com HA a causa da doença é idiopática (OHMORI, 2018). A HA é caracterizada pela neutralização e depuração acelerada dos fatores de coagulação do plasma. A incidência relatada de HA varia entre 0,1 e 1,5 casos em cada um milhão de pessoas por ano, atingindo principalmente gestantes e idosos (BAUDO et al.; 2012).

A deficiência dos fatores de coagulação afeta diretamente a cascata de coagulação e hemostasia dos pacientes, resultando em sintomas como episódios hemorrágicos frequentes, hemorragias nas cavidades da pele e do corpo, dor, deficiência ortopédica e morbidade significativa tanto para a forma congênita da doença como para forma adquirida (SHERMAN; BISWAS; HERZOG; 2017).

Tabela 1 - Sintomas da Hemofilia A de acordo com a gravidade da doença

Gravidade	Atividade de FVIIIc	Sintomas	Idade média de diagnóstico
Grave	<1%	Sangramento espontâneo frequente; sangramento anormal após pequenas lesões, cirurgias e extrações dentárias	Idade ≤2 anos
Moderada	1%-5%	Sangramento espontâneo raro; sangramento anormal após pequenas lesões, cirurgias e extrações dentárias	Idade <5-6 anos
Branda	>5%-40%	Sem sangramento espontâneo; sangramento anormal após lesões graves, cirurgia ou extrações dentárias	Fase mais tardia da vida dependendo da atividade homeostática

Fonte: Adaptado de KONKLE; HUSTON; FLETCHER, 2000.

Opções de tratamento da Hemofilia A e limitações

Em 1950 e no início da década de 60, o tratamento para hemofilia A era feito pela reposição do FVIIIc por meio de doação de sangue total e do plasma, melhorando o tempo de coagulação do paciente hemofílico. Entretanto, a quantidade de FVIIIc era insuficiente para estancar os sangramentos graves (FRANCHINI; MANNUCCI, 2012). Em seguida, em meados de 1964, iniciou-se a utilização de crioprecipitados, hemocomponente que contém grandes quantidades de fatores de coagulação XIII (FXIII), FVIII, Fator de von Willebrand (FvW) e fibrinogênio, o que resultou em um grande avanço no tratamento dos pacientes hemofílicos (BALKARANSINGH; YOUNG; 2017).

Na década de 70, a utilização de concentrados plasmáticos de fatores de coagulação liofilizados aumentou e possibilitou o controle de hemorragias e diminuiu os danos musculoesqueléticos, sintoma frequente nos pacientes hemofílicos não tratados (FRANCHINI; MANNUCCI, 2012). Na mesma década, uma nova alternativa terapêutica foi o desenvolvimento do medicamento desmopressina, análogo da vasopressina, um antidiurético utilizado originalmente

para diabetes. A desmopressina entretanto foi utilizada para aumento dos níveis plasmáticos de FvW, FVIII e Ativador tecidual do plasminogênio. (FRANCHINI, 2011).

Nos anos seguintes, início dos anos 80, se observou aumento do número de infecções virais, tais como, hepatites (B e C), síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), entre outras; devido a utilização de transfusões sanguíneas, infectando 60-70% dos pacientes hemofílicos, gerando a necessidade de tratamentos mais seguros. O avanço no conhecimento de métodos mais sensíveis e específicos para o diagnóstico de doenças infecciosas, especialmente para detecção do vírus do HIV permitiram o uso mais seguro de sangue e seus derivados para estes pacientes (BALKARANSINGH; YOUNG; 2017).

Com o avanço da Biologia Molecular, em 1989, foi possível o desenvolvimento do Fator VIII recombinante (FVIIIr) e seu uso clínico possibilitou uma nova maneira de tratar os hemofílicos. Entretanto, a reposição de FVIIIr em pacientes com hemofilia grave levou, e ainda leva a formação de anticorpos neutralizantes em 20-30% dos casos, tornando a terapia ineficaz (SHERMAN; BISWAS; HERZOG; 2017). Ademais, nos casos em que a terapia é efetiva, a administração de FVIIIr é por via intravenosa e deve ser feita múltiplas vezes por semana, o que dificulta a adesão do tratamento por problemas de acesso venoso, restrição de tempo, esquecimento, entre outras razões (FRANCHINI, 2011).

As limitações que os tratamentos atuais da hemofilia A possuem levam à necessidade de desenvolvimento de novas terapias mais eficientes e seguras para os pacientes (FRANCHINI; MANNUCCI, 2012).

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é revisar a literatura para a busca de artigos científicos que apresentam relevância na compreensão da fisiopatologia, aspectos genéticos e moleculares da hemofilia A e analisar criticamente novos tratamentos terapêuticos descritos já estabelecidos no mercado ou em fase desenvolvimento tais como os FVIIIr, imunotolerância induzida (ITI), Agentes *bypassing*, anticorpos

monoclonais e terapias gênicas e também descrever como esses tratamentos beneficiam clinicamente os pacientes hemofílicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Estratégias de pesquisa

Foram utilizadas as seguintes bases científicas de dados habilitadas pela rede da Universidade de São Paulo como: PubMed®, Web of Science®, UpToDate® e SciElo® para pesquisa de artigos científicos disponíveis em texto completo, sendo selecionados a partir dos resumos disponibilizados. Na busca destes foram empregadas palavras-chave, como: “hemofilia A”, “hemofilia A adquirida”, “Inibidores”, “fisiopatologia”, “aspectos moleculares”, “tratamento”, “novas terapias”, “FVIII recombinante”, “agentes *bypassing*”, “terapia gênica”, “imunotolerância”, “anticoagulantes naturais” e outras, sendo pesquisadas individualmente ou combinadas entre si, em português e em inglês. Também foram consultados sites oficiais para a obtenção de informações importantes ao desenvolvimento do trabalho e relacionados à Saúde e à Legislação pertinente.

3.2. Critérios de inclusão

Foram selecionados artigos científicos que atendiam o objetivo do trabalho, sendo os critérios de inclusão utilizados:

- Data de publicação: artigos com data de publicação posteriores a 2009 (dez anos) para descrição da fisiopatologia da hemofilia A e posteriores a 2012 para descrição de novos tratamentos;
- Idioma: apenas artigos de língua portuguesa ou inglesa;
- Relevância: artigos que descreveram dados de eficácia e segurança para o tratamento.
- Fase de desenvolvimento: artigos científicos que descreveram medicamentos em fase de desenvolvimento clínico ou já estabelecidos no mercado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da seleção por meio de análise de resumos e critérios de seleção mencionados nos Materiais e Métodos, foram selecionados 18 artigos que possibilitaram a compreensão aprofundada dos aspectos moleculares e genéticos da fisiopatologia da hemofilia A. Foram também selecionados mais 28 artigos para descrição dos tratamentos atuais e em desenvolvimento, bem como o benefício clínico para os pacientes. As opções terapêuticas selecionadas foram classificadas em cinco categorias de tratamento: FVIIIr, ITI, Agentes *bypassing*, anticorpos monoclonais e terapia gênica. As referência de tratamento foram selecionadas a partir da relevância, destaque na literatura e melhores respostas clínicas; estão incluídos medicamentos já aprovados pelas agências reguladoras, como *Food and Drug Administration* (FDA), e também medicamentos em fase de ensaios clínicos. As Figuras 1 e 2 mostram os resultados obtidos após a busca na literatura.

Figura 1: Resultados obtidos da literatura para descrição de aspectos gerais da hemofilia A e fisiopatologia utilizando a metodologia descrita.

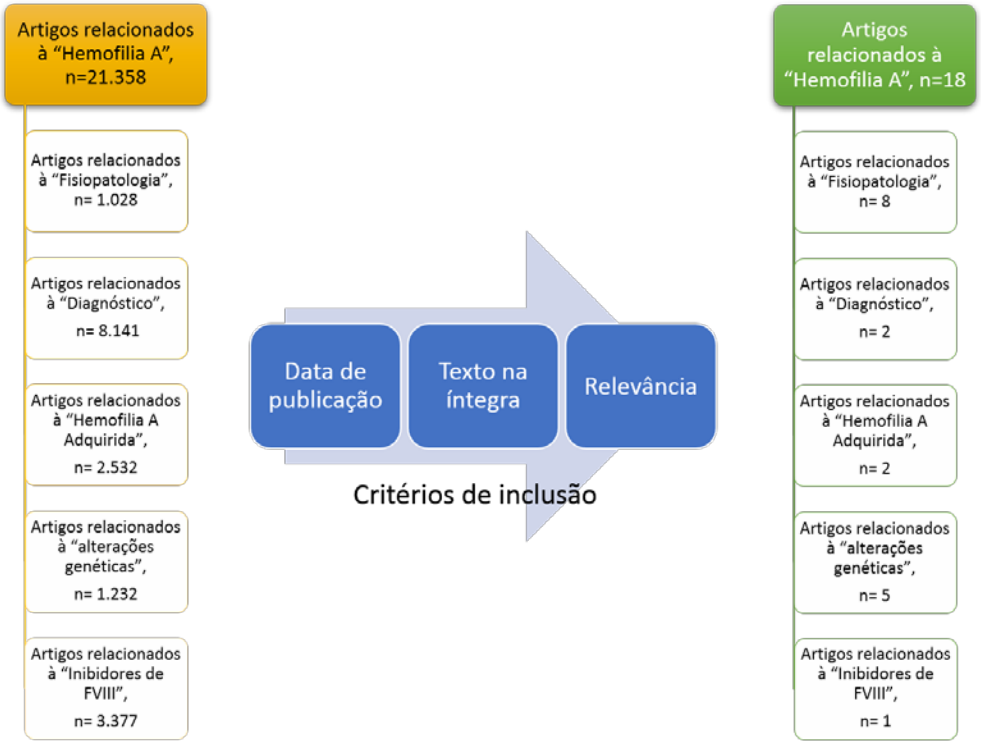
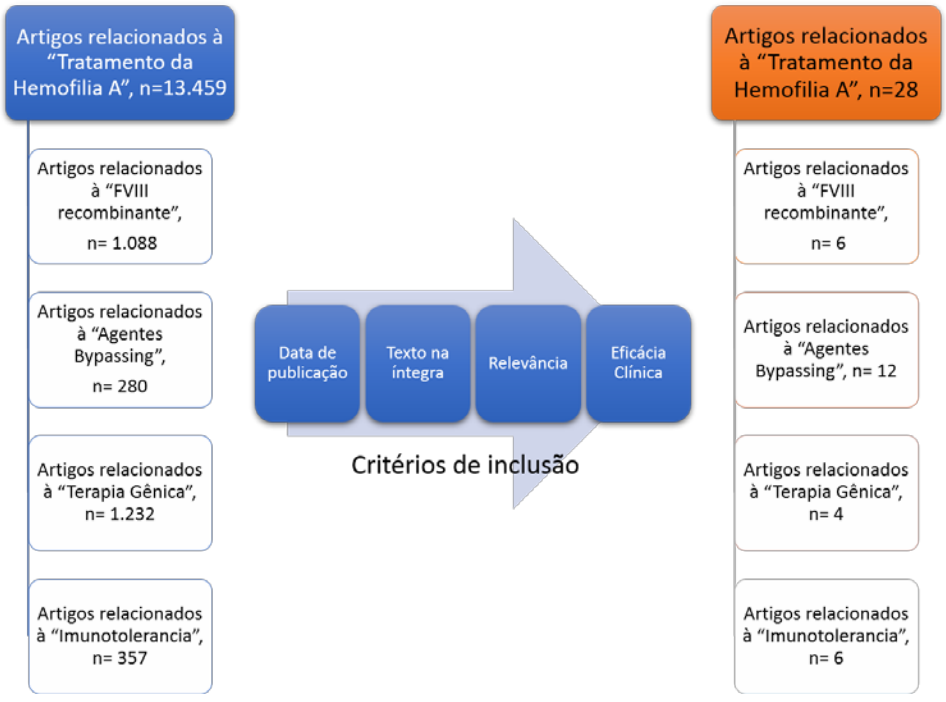


Figura 2: Resultados obtidos da literatura para as opções de tratamento da hemofilia A utilizando a metodologia descrita.



4.1 Fisiopatologia da Hemofilia A

4.1.1 Processo Hemostático

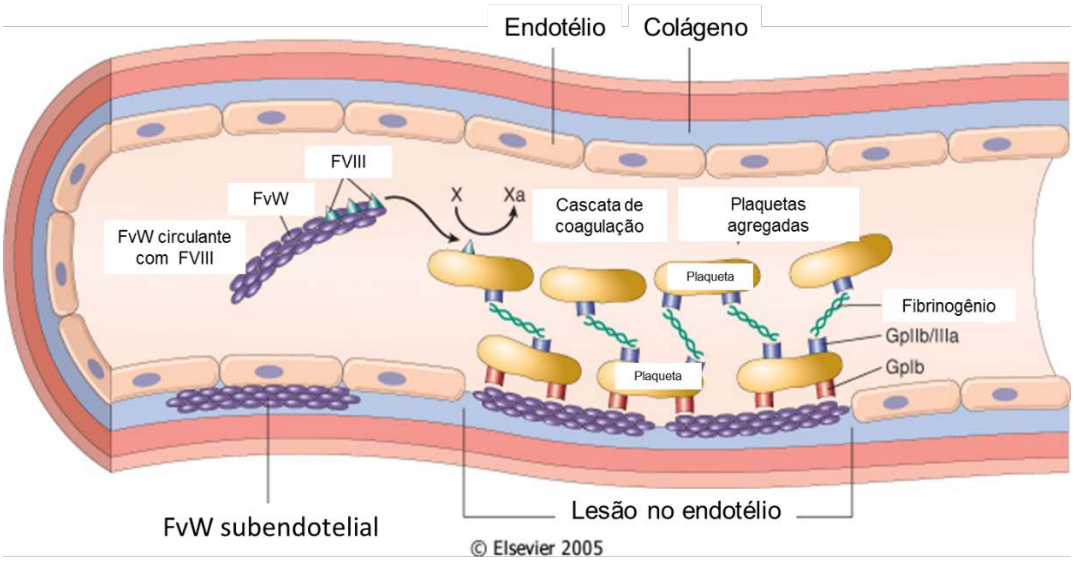
A hemostasia depende de diversos fatores que regulam o funcionamento do organismo. Compreender a hemostasia e os elementos que a regulam é de suma importância para entendimento da fisiopatologia de doenças hemorrágicas como a hemofilia A (PALTA S.; SAROA; PALTA A., 2014).

A hemostasia compreende o processo de formação do trombo, quando há uma lesão, e também, a lise da rede de fibrina após a cicatrização (sistema fibrinolítico), tendo como objetivo manter a fluidez do sangue. O processo de coagulação está dividido didaticamente, em duas fases: a hemostasia primária, na qual ocorre a agregação plaquetária e formação do trombo branco ou plaquetário. Na hemostasia secundária, ocorre a geração de trombina que vai clivar o fibrinogênio em monômeros de fibrina, os quais se organizam formando a rede de fibrina (trombo) (HALL, J., 2010; GALE, 2010).

O processo de coagulação tem início quando ocorre alguma lesão nos vasos sanguíneos, consequentemente o rompimento do endotélio e exposição da matriz subendotelial ao sangue. A partir do contato do sangue com os fatores presentes na matriz subendotelial tais como colágeno, FvW, fator Tecidual (fT), etc., há a ligação de plaquetas por intermédio de suas glicoproteínas Ib, ao FvW subendotelial seguido da ligação do fibrinogênio às plaquetas por intermédio de suas glicoproteínas IIb-IIIIa presentes na membrana, formando uma rede de plaquetas agregadas, como mostrado na Figura 3 (HALL, J., 2010).

Ao se ligar ao FvW, as plaquetas que antes possuíam forma discoide, assumem a forma irregular com o objetivo de aumentar a superfície de contato com o sangue. A forma ativada das plaquetas estimula a produção de Tromboxano A2 que irá estimular a agregação de mais plaquetas e formação do tampão hemostático primário (GALE, 2010).

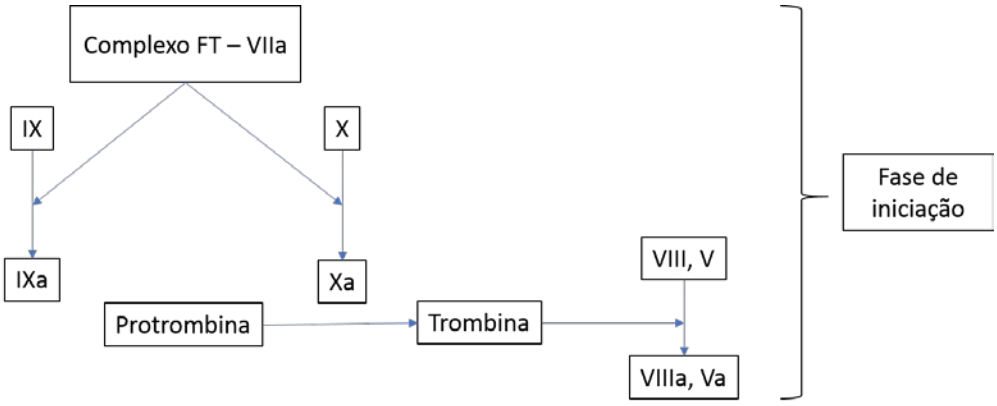
Figura 3: Exposição do tecido subendotelial ao sangue; ligação do FvW à plaquetas e início da cascata de coagulação.



Fonte: www.memorangapp.com (2019).

Paralelamente a este processo, há a ativação da cascata de coagulação, que tem o início com a exposição do fT seguid pela expressão do complexo fosfolípide pelas plaquetas, formação da trombina ativada e polimerização da fibrina. Atualmente existe um modelo de concepção da cascata de coagulação classificado em fase de iniciação, amplificação e propagação além da antiga concepção de via intrínseca e via extrínseca. Na fase de iniciação, o fT se liga ao fator de coagulação VII ativado (FVIIa) circulante e ativa os fatores de coagulação IX e X (FIX e FX). O complexo fT-FVIIa serve tanto para a via intrínseca tanto para a via extrínseca da cascata de coagulação. Com a ativação de FX (FXa), há a ligação deste ao fator de coagulação II, protrombina (FII) para a formação de trombina (FIIa), Figura 4 (PALTA S.; SAROA; PALTA A., 2014).

Figura 4: Concepção de fase de iniciação de coagulação

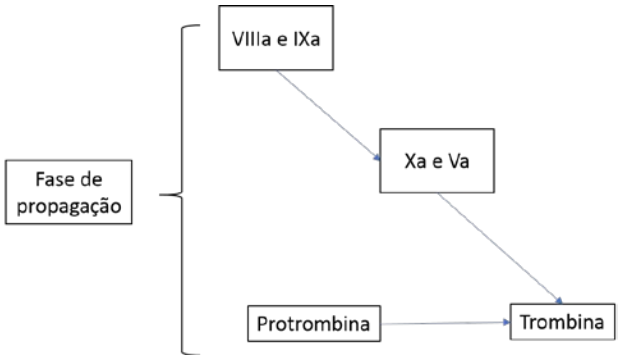


Fonte: Adaptado de PALTA; SAROA; PALTA, 2014.

Na fase de amplificação (Figura 5), como a quantidade de trombina ainda é baixa, a ligação de plaquetas com a trombina gera o processo de *feedback* positivo para amplificação de sua produção. A trombina gerada inicialmente ativa ainda mais os fatores de coagulação V (FV) e FVIII, este último, é um cofator de FII e acelera a ativação de FII por FXa e de FXa por FIXa (PALTA S.; SAROA; PALTA A., 2014).

O acúmulo de FXa e protrombinase na superfície plaquetária proporciona a ativação destas. Este processo mantém a geração de trombina, e consequentemente, de fibrina, para formação do trombo. A geração de trombina também leva a ativação do FXIII, fator de estabilização de fibrina, que liga covalentemente os polímeros de fibrina e proporciona estabilidade na formação do tampão plaquetário (PALTA S.; SAROA; PALTA A., 2014).

Figura 5: Concepção de fase de propagação de coagulação



Fonte: Adaptado de PALTA; SAROA; PALTA, 2014.

O processo hemostático também envolve a fibrinólise, ou seja, dissolução do tampão hemostático estável após a cicatrização do vaso sanguíneo lesado. O sistema fibrinolítico é composto por serina proteases, como a plasmina, que é gerada a partir do plasminogênio e tem como função a clivagem da fibrina. O controle inibitório do sistema fibrinolítico é feito por inibidores chamadas serpinas, que tem como principais agentes o inibidor do ativador de plasminogênio 1, inibidor do ativador de plaminogênio 2 e o α-2 antiplasmina (CHAPIN, J.; HAJJAR, K., 2015).

O processo de feedback negativo para controle do processo de coagulação é importante para evitar a coagulação excessiva e trombose e manter o equilíbrio hemostático. A trombina tem papel fundamental para feedback negativo deste processo, pois ativa o plasminogênio para formação de plasmina e estimula também a produção de antitrombina. A antitrombina possui como atividade no processo de feedback negativo a diminuição da produção de trombina e decrescimento da atividade de FXa (CHAUDHRY, R.; BABIKER, H., 2019).

O balanço homeostático entre eventos que favorecem o sangramento e a coagulação se mantém normal em circunstâncias fisiológicas. Entretanto, em casos de patologias, há um desbalanço entre estes eventos e ocorrem complicações hemorrágicas ou trombóticas. No caso da hemofilia A, a deficiência ou ausência da atividade do FVIII resulta em ocorrências hemorrágicas e sintomas correlatos (PALTA S.; SAROA; PALTA A., 2014).

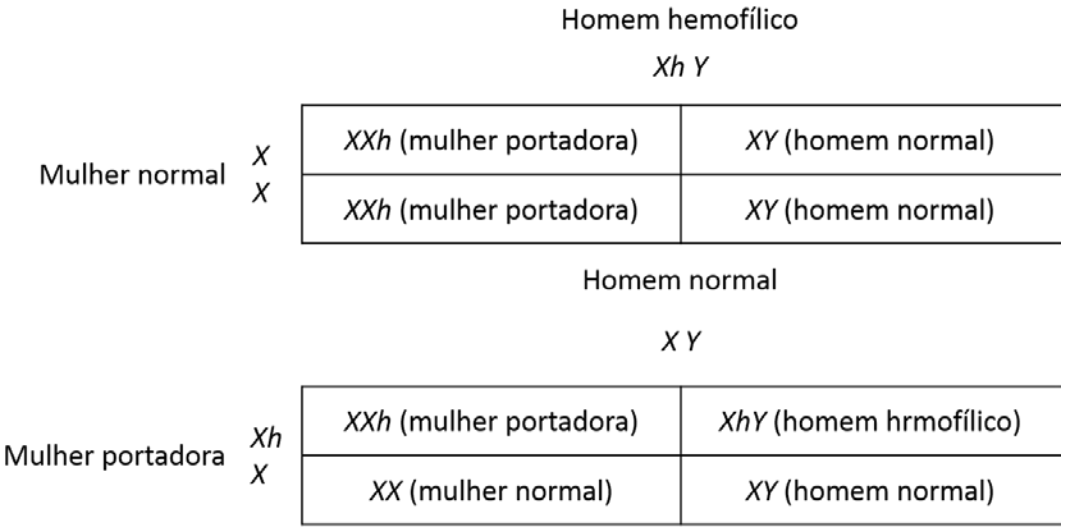
4.1.2 Aspectos genéticos e moleculares

A hemofilia A é uma doença recessiva ligada ao cromossomo X que tem como causa a alteração moleculares no gene responsável pela síntese de FVIII. Até 2017, foram identificadas mais de 3.000 diferentes mutações responsáveis pela redução da atividade do FVIIIc além das alterações moleculares mais comuns, como as inversões dos íntrons 1 e 22. Conhecer as principais alterações genéticas, poderiam auxiliar no manejo durante a gravidez e também nos neonatos. No entanto, isso não foi possível devido à grande variabilidade e mutações de novo. (INABA et al., 2017).

Na Figura 6 está apresentada como a herança é transmitida aos filhos e como filhas de hemofílicos, consequentemente, transmitirem aos seus filhos. As

mulheres portadoras podem ter concentrações plasmáticas de FVIII abaixo da concentração de indivíduos saudáveis, entretanto não possuem problemas no processo hemostático (AY et al., 2010).

Figura 6: Herança paterna da hemofilia, ilustrando como filhas de homens hemofílicos possuem 50% de chances de serem portadoras do gene mutado e como isso pode ser transmitido para seus filhos.



X, cromossomo normal; Xh cromossomo com o gene mutado; XhY, homem hemofílico; XX, mulher normal; XXh, mulher portadora do gene mutado; XY, homem normal; Y, cromossomo normal.

Fonte: Adaptado de MONROE; HOFFMAN; ROBERTS, 2015.

O gene responsável pela síntese de FVIII está localizado no braço longo do cromossomo X (X-q28), possui tamanho de 186-kb de DNA genômico, 25 íntrons e 26 éxons que codificam 2351 aminoácidos precursores do peptídeo. O peptídeo é sintetizado em uma cadeia e possui 6 principais domínios: A1, A2, B, A3, C1 e C2. Após sofrer processo proteolítico pelo complexo de Golghi dos hepatócitos, a proteína adquire nova forma de dupla cadeia, sendo os domínios A1, A2 e B constituintes da cadeia pesada e A3, C1 e C2 da cadeia leve. O domínio C2 é responsável pela ligação de FVIII ao FvW e à superfície de plaquetas, alguns estudos sugerem também a ligação de C2 à outras proteínas como FXa e trombina. Na hemofilia A, as mutações genéticas modificam a interação destes domínios com

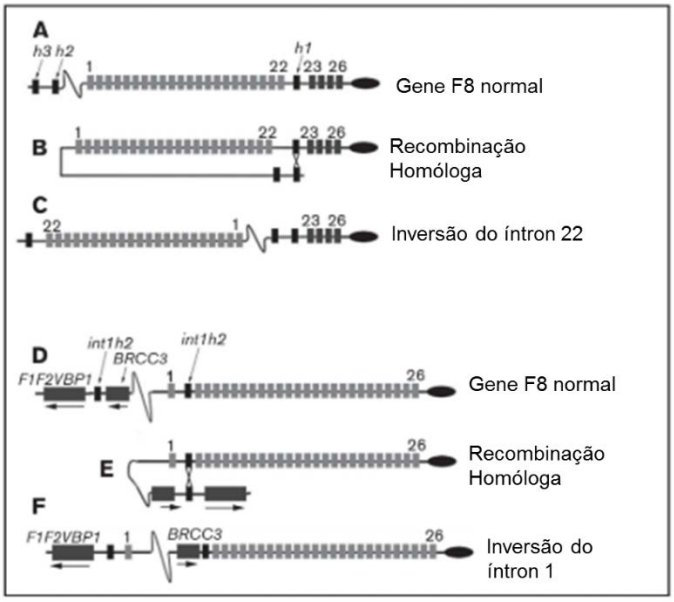
os sítios de ligação levando a ineficácia da ação do fator de coagulação (MANNUCCI, 2018; TANTAWY, 2010).

Existem muitas mutações do gene do FVIIIc que causam a hemofilia, entretanto, as inversões dos íntrons 22 e 1 são responsáveis por 40-50% e 5-7%, respectivamente, dos casos graves da doença. Outras mutações menos prevalentes foram identificadas nos pacientes com hemofilia A, como por exemplo, mutações pontuais, inserções e mutações do tipo *splicing* (CHEN et al., 2010).

Atualmente existem três principais métodos que analisam as modificações genéticas do gene codificador do FVIII, sendo elas a) Sequenciamento direto da fração codificadora do FVIII, promotor e 3'UTR e fronteiras íntron-exon tanto por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) quanto por sequenciamento Sanger e N*ext Generation Sequencing* (NGS); b) Análise de inversões 22 por Southern blot e inversão 1 por PCR; c) Análise de número variante por *Multiplex Ligation-Probe Amplification analysis* (MLPA) ou ensaio de sequenciamento comparativo de hibridização genômica (INABA et al., 2017).

No íntron 22 existem duas regiões; F8A (denominado h1 na Figura 7), que é transcrito na direção 5' para 3' e F8B que é transcrito na direção 3' para 5' do gene do FVIII. Durante o processo de meiose, ocorre a inversão do gene seguido por crossing over das as partes extra gênicas homólogas à h1 denominadas h2 e h3. Existe também a possibilidade de inversão intra gênica do íntron 1 através da recombinação homóloga da região h1 com a região h2, localizada entre dos genes VBP1 E BRCC3 (DUTTA et al.,2016).

Figura 7: Inversão gênica por recombinação homóloga do íntron 22 (A-C) e íntron 1 (D-F).



Retângulos cinzas claros representam éxons 1 a 22, retângulos cinza escuro representam éxons e retângulos pretos indicam as sequências homólogas h1, h2 e h3. F1 e F2 representam éxons do genes VBP1.

Fonte: Adaptado de DUTTA, et al. 2016.

É importante reforçar a relação entre o genótipo e o fenótipo dos pacientes afetados por essas mutações. Nos casos mais graves da doença são encontradas principalmente as mutações relacionadas às inversões (aproximadamente 50% para mutações de inversão do íntron 22 e 5% para a mutações de inversão do íntron 1) e também as mutações relacionadas à grandes deleções no gene em 5% dos pacientes com hemofilia grave. Para o restante dos pacientes com hemofilia grave, moderada e branda, existem inúmeras variações de mutações pontuais, pequenas inserções e deleções, as quais 30% são mutações *de novo* (TANTAWY, 2010).

4.1.3 Diagnóstico da hemofilia A

4.1.3.1 Triagem do processo de coagulação

A hemofilia A pode ser diagnosticada por triagem do processo de coagulação, no qual dois parâmetros são avaliados: avaliação do número e função das plaquetas e características hemostáticas. Dois principais testes para avaliar a

capacidade hemostática dos pacientes podem ser realizados, o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) e o Tempo de Protrombina (TP). Para os pacientes hemofílicos, a contagem e analise de plaquetas e TP apresentam resultados normais e dentro dos valores de referência. Já o teste de TTPA apresenta valores acima dos valores de referência para os casos moderados e graves. (Valores de referência de TP e TTPA: 11-15 segundos e 35 segundos, respectivamente) (TANTAWY, 2010).

4.1.3.2 Triagem dos níveis de atividade de FVIIIc

Para indivíduos com histórico familiar da doença e com sangramentos frequentes, testes para medir os níveis de atividade do FVIII são indicados, uma vez que testes de coagulação podem apresentar valores normais. Os níveis de atividade de FVIIIc quantificados por testes coagulométricos, e possui valores de referência de 50-150%, em indivíduos saudáveis. Em hemofílicos estes valores são menores ou iguais a 30-40% (TANTAWY, 2010).

4.1.3.3 Aspectos genéticos no diagnóstico da hemofilia A

Nos casos hereditários, é fundamental identificar mulheres portadores, uma vez que estas podem transmitir a doença para seus filhos. Esta avaliação pode ser feita através de sequenciamento genéticos para identificação de mutações como as inversões de íntrons 22 e 1 por métodos como *Southern blot* ou PCR (MONROE; HOFFMAN; ROBERTS, 2015).

4.2 Opções de tratamento da hemofilia A

4.2.1 FVIII Recombinante

Atualmente, a opção mais utilizada e considerada como padrão de tratamento dos pacientes hemofílicos é a reposição de FVIII pelo uso de FVIIIr, tanto como profilaxia quanto para uso em episódios hemorrágicos. O uso de FVIIIr é fundamental aos paciente com hemofilia grave pelo fato de impedir artropatias mais graves. (SRIVASTAVA et al., 2013).

Visando minimizar os riscos de infecções que o FVIII de derivados plasmáticos poderiam transmitir, no início dos anos 90, foram desenvolvidos os fatores recombinantes utilizando a tecnologia do DNA recombinante. Os FVIIIr desenvolvidos a partir de proteínas humanas ou animais podem ser classificados em produtos de primeira, segunda, terceira e quarta gerações (MANNULLY; RAMYA; PULICHERLA, 2018).

A primeira geração de produtos (Recombinate (Baxter Bioscience), Kogenate/Helixate (Bayer)), desenvolvidos em 1990, baseavam-se na albumina humana ou animal como estabilizador na produção e formulação final. Já a segunda geração de FVIIIr (ReFacto (Wyeth Inc. Pfizer)), a albumina era utilizada somente como nutriente na cultura celular e não como estabilizador. Na terceira geração (Advate (Baxter)), a produção desses fatores não utilizava albumina para nenhum processo de produção. A vantagem de não se utilizar a albumina humana ou derivada de animal é a diminuição do número de etapas envolvidas na produção, como a etapa de inativação viral. A quarta e última geração de produtos desenvolvidos (Eloctate e Nuwiq) foram produzidos em células humanas sem a utilização de proteínas humanas ou derivada de animais (MANNULLY; RAMYA; PULICHERLA, 2018).

Os fatores recombinantes atualmente utilizados para profilaxia possuem tempo de meia vida aproximadamente 12 horas, e por isso devem ser aplicados diariamente pela via intravenosa aos pacientes, o que pode levar à dificuldades na adesão ao tratamento e também a não efetividade do mesmo (MANCUSO; SANTAGOSTINO, 2017).

Visando um maior tempo de meia vida dos FVIIIr, comodidade dos paciente e aumento da adesão, existem atualmente duas principais alternativas aprovadas pela Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, FDA. As tecnologias de fusão de Fc, região da Imunoglobulina G humana (IgG), e PEGlação, permitem o aumento do tempo de meia vida do FVIIIr (PEYVANDI; GARAGIOLA; BIGUZZI, 2016).

A tecnologia desenvolvida pelo laboratório Bioverativ/Sobi, está aprovada pelo FDA desde o ano de 2014, e possui nome comercial Eloctate. O mecanismo

utilizado por este produto é a fusão da porção Fc da IgG ao FVIII para extensão do tempo de meia vida. A porção Fc da IgG permite que esta imunoglobulina seja reciclada via receptores neonatais (FcRn) que a protege da degradação lisossomal. Desta forma, ela não sofre degradação, é reciclada e retorna à circulação. Utilizando este mecanismo, a porção Fc foi acoplada ao FVIII para extensão do tempo de meia vida (19.7 ± 2.3 horas) e diminuição do clearance do Eloctate (PEYVANDI; GARAGIOLA; BIGUZZI, 2016; POWELL, 2015).

A outra tecnologia empregada nos fatores recombinantes é a chamada *PEGlação*, que consiste no uso do polietilenoglicol para ligação ao FVIII e, assim como o Eloctate, aumenta o tempo de meia vida (14,7 ± 3,8 horas) e diminui o clearance do FVIIIr. Atualmente existe um produto disponível comercialmente que utiliza esta tecnologia, o Adynovate (BAX 855) que foi aprovado pelo FDA em 2015. Entretanto, existem outros produtos em fase de desenvolvimento, ensaios clínicos de fase 3 que demonstraram aumento do tempo de meia vida de FVIII para 19 horas, aproximadamente (MULLINS et al., 2017).

A Tabela 2 mostra os principais FVIIIr com tempo de meia vida estendido desenvolvidos até 2018 bem como a tecnologia empregada, célula de produção, extensão da molécula e tempo de meia vida (KORTE; GRAF, 2018).

Tabela 2: Principais FVIIIr, tecnologia utilizada para extensão do tempo de meia vida e célula de origem.

Nome genérico	Nome	Tecnologia	Célula de origem	Comprimento da molécula	Tempo de meia vida
Efmoroctocof alfa	Elocta	Fusão Fc	HEK	Domínio B deletado	19 horas
Rurioctacog alfa pegol	Adynovi	PEGlação	CHO	Comprimento total	14-16 horas
Turoctocof alfa pegol	-	PEGlação	CHO	Domínio B cortado	19 horas
Damoctocog alfa pegol	-	PEGlação	BHK	Comprimento total	19 horas
Lonoctocog alfa	Afstyla	Ligação covante entre cadeia leve e pesada e afinidade do FvW aumentada	CHO	Domínio B deletado	14,5 horas

CHO: *Chinese Hamster Ovary*; HEK: *Human Embryonic Kidney*; BHK: *Baby Hamster Kidney.*

Fonte: Adaptado de KORTE; GRAF, 2018.

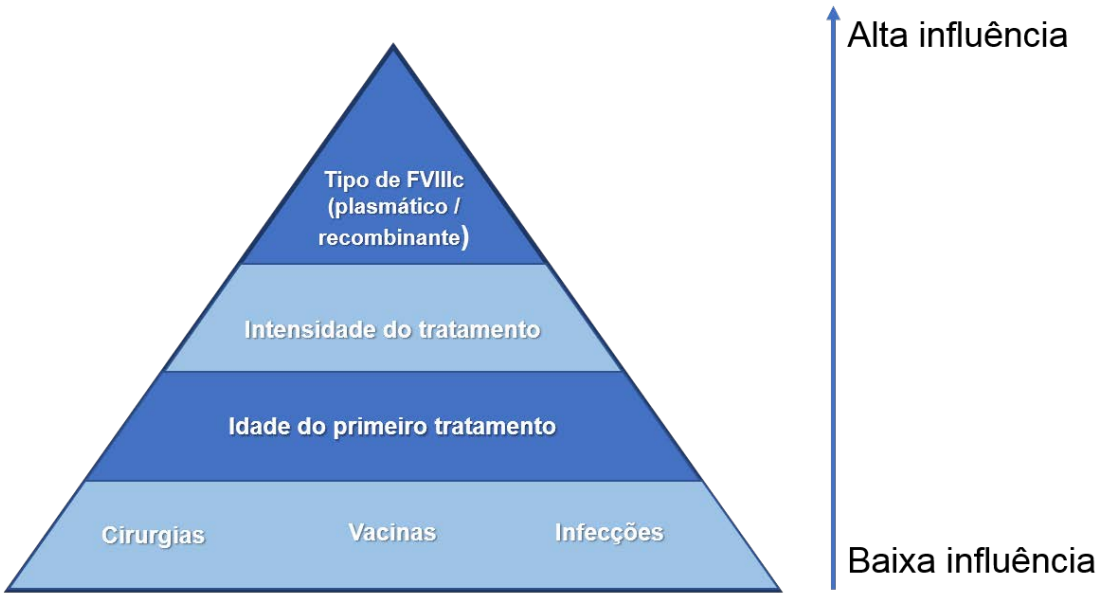
4.2.2 Imunotolerância induzida

O mecanismo de formação dos inibidores de FVIII ainda não é completamente esclarecido, entretanto, acredita-se que a etiologia possa ser proveniente de fatores múltiplos e interligados entre determinantes genéticas e do ambiente. Algumas variáveis contribuem para formação dos inibidores como a gravidade da doença, tipo de FVIII administrado, idade de exposição ao primeiro tratamento, dosagem utilizada no tratamento, interferências como cirurgias, sangramentos graves, vacinas e infecções (LÖVGREN et al., 2016).

Os inibidores de FVIII são anticorpos policlonais, principalmente das subclasses IgG4, IgG1 e IgG2 que possuem como alvos os domínios A2, A3 e C2 da proteína FVIII. A identificação dos fatores interferentes na formação de inibidores é importante para antecipar, prever e evitar a formação dos mesmos para benefício dos pacientes (HOFBAUER et al., 2016).

Estudos observacionais, meta análise e análise sistemática de revisão bibliográfica demonstraram outras variáveis que podem influenciar diretamente na formação dos inibidores porém não possuem resultados muito conclusivos. Os apontamentos desses estudos indicam que FVIII de derivados plasmáticos possuem menores chances de desenvolvimento de inibidores do que FVIII recombinantes. Além deste fator, estudos relacionados à idade de início de tratamento apontam a maior chance de desenvolvimento dos inibidores para hemofílicos com menor idade. Outros fatores estudados, como traumas, cirurgias e infecções próximos à exposição do FVIII indicam uma maior possibilidade de desenvolvimento de inibidores. A hipótese que sustenta os resultados obtidos por esses estudos é que a exposição do FVIII à linfócitos T auxiliares CD4+ (*Clouster of Differention* 4) na presença de hemorragias graves, lesões, etc., aumenta a resposta imunológica adaptativa e com isso há mais chances do desenvolvimento dos inibidores. A Figura 8 ilustra a influência de cada fator no desenvolvimento dos inibidores de FVIII (PEYVANDI; GARAGIOLA, 2017).

Figura 8: Relevância dos fatores ambientais no desenvolvimento de inibidores de FVIII.

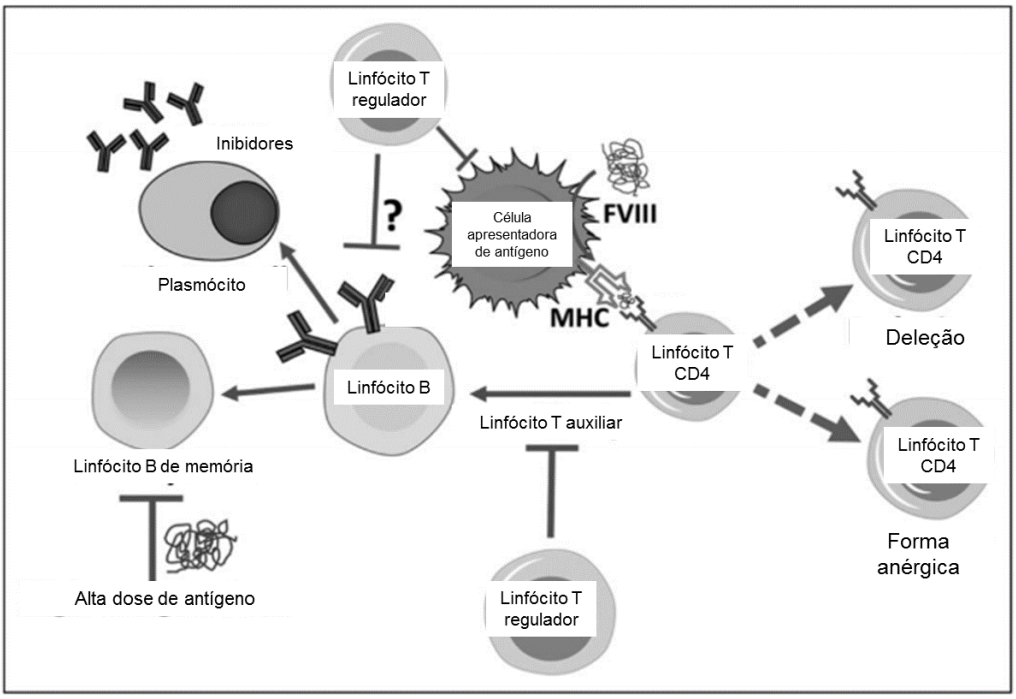


Fonte: Adaptado de PEYVANDI; GARAGIOLA, 2017

A resposta imunológica adaptativa ao FVIII tem início quando as células apresentadoras de antígeno encontram os antígenos do FVIII reposto e apresentam estes aos linfócitos T CD4+ via completo principal de histocompatibilidade (MHC - *Major Histocompatibility Complex*) de classe 2. Os linfócitos T CD4+ então possibilitam que os linfócitos B produzam os anticorpos que neutralizarão o FVIII reposto (seja de origem plasmática ou recombinante). Para a indução da imunotolerância, é necessário que os pacientes recebam altas doses de FVIII, 200 IU/kg/dia. O mecanismo de ação descrito na literatura é que a administração de altas doses de FVIII pode suspender a atividade dos linfócitos T pela estimulação exacerbada pelos antígenos, levando a deleção ou forma anérgica da célula. Altas doses também podem também eliminar células B de memória. A imunotolerância é considerada efetiva quando o título de inibidores atinge valores abaixo de 0,6 BU/ml e a função de FVIII é normalizada. Os resultados clínicos observados nos pacientes com hemofilia A geralmente são de 60-70% na erradicação da formação de inibidores, demonstrando grandes chances de benefício. Entretendo, mesmo para pacientes que tiveram benefício clínico após o tratamento de ITI a formação de inibidores pode retornam quando reexpostos ao FVIII (SHERMAN; BISWAS; HERZOG, 2018).

A Figura 9 ilustra os componentes celulares envolvidos na formação dos anticorpos inibidores de FVIII e como o mecanismo da imunotolerância induzida inibe a formação dos anticorpos neutralizantes de FVIII. As células apresentadoras de antígenos apresentam antígenos derivados de FVIII via receptor MCH de classe II para os linfócitos T CD4+. Estas células podem se diferenciar em linfócitos T auxiliares e ativar as células B, que por sua vez, irão produzir anticorpos. O desenvolvimento de inibidores pode ser suprimido por linfócitos T reguladores e também pela inibição direta de linfócitos B (SHERMAN; BISWAS; HERZOG, 2018).

Figura 9: Elementos que modulam a formação de inibidores de FVIII.



Fonte: Adaptado de SHERMAN; BISWAS; HERZOG, 2018

Algumas outras técnicas estão em desenvolvimento para possibilitar aos pacientes maiores chances de erradicação de inibidores. A terapia gênica, a utilização de imunomoduladores, como a rapamicina, administrados juntamente com o FVIIIc, os FVIIIr ligados à porção Fc, o Fator de coagulação VII (FVII) encapsulados em alfaces e ingeridos oralmente, podem, futuramente, ser opções viáveis para aumento da tolerância (WANG; TERHORST; HERZOG, 2016).

4.2.3 Agentes *bypassing* tradicionais

A incidência de desenvolvimento de anticorpos neutralizantes de FVIII é de aproximadamente 30% em pacientes com hemofilia grave e menor em pacientes com hemofilia moderada e leve, 3-13% (VELZEN et al., 2017).

A opção de tratamento por agentes *bypassing*, isto é, opções que não utilizam o FVIII como reposição, e sim outras alternativas como por exemplo complexos de FII ativada, FVIIa recombinantes, entre outros, é a escolha mais

utilizada para os pacientes hemofílicos que possuem alta taxa de inibidores do FVIII (valores superiores a 5 BU/ml). Existem dois agentes atualmente comercializados no mercado, os produtos FEIBA, chamado de Complexo Coagulante Anti-inibidor ativado (aPCC), desenvolvido pela empresa Shire nos anos 70 e NovoSeven, que é um FVIIa recombinante também chamado de Ectacog Alfa, desenvolvido pela empresa Novo Nordisk nos anos 80 são as opções de tratamento mais tradicionais e que contornam a necessidade reposição por FVIII (GIANGRANDE el al., 2018).

O aPCC consiste num concentrado plasmático de múltiplos zimogênios e de fatores de coagulação ativados. O complexo é composto principalmente por FII, FXa e FVIIa e desempenha papel fundamental no controle hemostático dos pacientes. Há possibilidade de acúmulo de zimogênios com o uso repetitivo deste produto, com isso, para se evitar possíveis complicações trombóticas, a dose diária máxima não deve ultrapassar 200 U/kg (SHARIPO; MITCHELL; NASR, 2018).

O fator recombinante FVIIa desenvolvido pela Novo Nordisk atua na via extrínseca da cascata de coagulação, contornando a necessidade de ativação de FVIII e FIX para a formação da trombina. A dose indicada para uso é de 90 µg/kg administrada a cada 2 horas até a hemostasia .O tratamento inicial recomendado para pacientes com inibidores de FVIII é o uso de NovoSeven, pois o FEIBA possui quantidades de FVIII que podem aumentar a resposta por inibidores (SHARIPO; MITCHELL; NASR, 2018).

Para os casos de hemofilia moderada e branda, o uso de desmopressina auxilia na prevenção da formação de inibidores do fator VIIIc (COLLINS et al., 2012).

4.2.4 Novos Agentes *bypassing*

Existem atualmente três novos agentes *bypassing* principais em desenvolvimento considerados promissores na terapêutica dos pacientes hemofílicos por possuírem mecanismo capazes de aumentar a hemostasia independente da reposição por FVIIIr. Esses produtos possuem mecanismo de ação únicos, tendo como alvo diferentes alvos na cascata de coagulação (FRANCHINI; MANNUCCI, 2018).

O Emicizumabe (Hemlibra, Roche/Genentech, USA) é um anticorpo monoclonal aprovado pelo FDA em 2017 para o uso profilático em pacientes hemofílicos com inibidores e é considerado uma alternativa terapêutica única capaz de transformar a rotina de tratamento dos pacientes (FRANCHINI; MANNUCCI, 2018).

O Fitusiran (Sanofi, França / Alnylam, USA) e o Concizumabe (NovoNordisk) são agentes que atuam inibindo a via anticoagulante e ainda estão em fase de testes clínicos (SHAPIRO, 2018). Os dados técnicos desses produtos estão aprsentados na Tabela 3.

Tabela 3: Novos agentes *bypassing* em desenvolvimento para hemofilia.

	Agentes *bypassing* em desenvolvimento		
	Emicizumabe	Fitusiran	Concizumabe
Fabricante	Chugai Pharmaceutical/ Hoffman-La Roche	Alnylam Pharmaceuticals	Novo Nordisk
Tecnologia	Anticorpo quimérico humanizado biespecífico	siRNA	Anticorpo monoclonal humanizado
Mecanismo de ação	Mimetização de FVIIIa	Inibição de antitrombina	Inibição do fT
Frequência de dose	Semanalmente	Semanalmente / Mensalmente	A ser determinado
Via de administração	Forma subcutânea	Forma subcutânea	Forma subcutânea
Fase do desenvolvimento	Aprovado pelo FDA	Fase 2 -3	Fase 2

Fonte: Adaptado de FRANCHINI; MANNUCCI, 2018.

4.2.4.1 Emicizumabe (ACE910)

O emicizumabe é um anticorpo monoclonal do tipo IgG4, humanizado e biespecífico desenvolvido a partir de células de ovários de hamsters chineses (SHIMA et al., 2016). Sua estrutura é quimérica, biespecífica e desenvolvida para se ligar especificamente no Fator de coagulação IX ativado (FIXa) e FX, mimetizando a função de FVIIIa e permitindo a formação de FXa. Uma vantagem frente aos FVIIIr, é que não há evidencia de formação de inibidores com a administração de emicizumabe (SAMPEI et al., 2013).

A administração do emicizumabe é feita de forma subcutânea e apresenta longos tempos de meia vida (4-5 semanas) e pode ser utilizado tanto em pacientes com hemofilia A congênita quanto adquirida. (SHIMA et al., 2016). A utilização de emicizumabe para terapia profilática, uma vez na semana (inicialmente com doses de 4mg/kg) demonstrou redução na frequência dos episódios hemorrágicos, inclusive para as hemartroses. (SHAPIRO, 2018; MUTO et al., 2014).

O estudo clínico de fase 3 com pacientes com inibidores demonstrou diminuição do número de episódios hemorrágicos para pacientes que utilizaram a terapia com emicizumabe de forma profilática (79%de redução) ou sob demanda (87% de redução), com pacientes com nenhum episódio hemorrágico no ano. Alguns eventos adversos foram apresentados ao longos dos estudos clínicos, principalmente micro angiopatias trombóticas. Por este motivo, é aconselhado realizar a monitorização dos aspectos de coagulação dos pacientes e fazer uso de doses baixas de rFVIIa e aPCC (OLDENBURG et al., 2017).

4.2.4.2 Fitusiran (ALN-AT3)

O Fitusiran (ALN-AT3) é um RNA de interferência pequeno (siRNA) e atua no silenciamento do gene de interesse. O agente foi desenvolvido para reduzir a transcrição da antitrombina no fígado. Como a antitrombina atua na inativação da trombina e FXa no plasma, a inibição de sua transcrição aumenta a quantidade de formação de trombina e dos outros fatores de coagulação (PASI et al., 2016).

O estudo clínico de fase 2 com administração cutânea de 50mg ou 80mg ao mês demonstrou redução da produção de antitrombina de aproximadamente 80% comparado aos valores de base. Também foi observado a diminuição dos episódios hemorrágicos nos pacientes que receberam fitusiran. Estudos de fase 3 estão em andamento e tem previsão de análise de dados em meados de 2019 (PASI et al., 2016; FRANCHINI; MANNUCCI, 2018).

4.2.4.3 Concizumabe

Uma outra estratégia adotada para atuar na cascata de coagulação é o controle inibitório do inibidor do fator tecidual (*Tissue Factor Pathway Inhibitor* - TFPI). A função de TFPI na cascata de coagulação é de se ligar ao complexo fT-FVIIa e ao FXa, regulando negativamente a cascata de coagulação (LAURITZEN et. al, 2019).

O concizumabe é um anticorpo monoclonal do tipo IgG4 que se liga especificamente ao domínio KPI-2 do complexo fT-FVIIa e inibe a sua ligação a FXa, evitando desta forma, a inibição da cascata de coagulação e aumentando a produção de trombina (PETERSON; MARONEY; MAST, 2016).

Estudos clínicos em fase de desenvolvimento, fase 1 e 2, demonstraram a eficácia de concizumabe com o aumento da produção de trombina para valores normais e não apresentaram eventos adversos graves (CHOWDARY, 2018).

4.2.5 Terapia Gênica

Embora as novas alternativas de opções de tratamento na hemofilia A, possibilitem o aumento de tempo de meia vida dos medicamentos e consequentemente o aumento do tempo de administração entre doses, tais opções ainda apresentam a necessidade de administrações periódicas. Considerando esta questão, a terapia gênica é uma opção de tratamento em desenvolvimento que vem apresentando resultados clínicos promissores no que se diz respeito à cura da doença (OHMORI, 2018).

A terapia gênica tradicional tem como objetivo substituir o gene mutado por um gene normal, no caso da hemofilia A, a substituição acontece no gene responsável pela síntese do FVIII. Diversos modelos animais foram utilizados para

desenvolvimento da terapia gênica aplicada à hemofilia, sendo que em suínos foram obtidos resultados promissores pois a coagulação sanguínea suína é parecida com a dos humanos (KASHIWAKURA et al., 2012).

A técnica se baseia na inserção da sequência gênica de interesse em células alvos, e tem como estratégia duas possibilidades de inserção: administração direta de vetores que carregam o gene de interesse ou o transplante de células com o gene de interesse transduzido. O ácido desoxirribonucleico codificador (DNAc) do gene de FVIII tem tamanho maior do que 7kb, o que impossibilita o empacotamento no compartimento viral, desta forma, a solução encontrada para o empacotamento do gene no vírus foi a exclusão do domínio B pois este não apresenta função na codificação da proteína (MCINTOSH et al., 2013).

A transferência de genes utiliza vetores que são utilizados para carregar o gene de interesse para a célula alvo, sendo os mais utilizados o vírus adeno associado (AAV), para administração do vetor in vivo, e o vetor *lentiviral* (LV) para transdução de células ex-vivo (OHMORI, 2018).

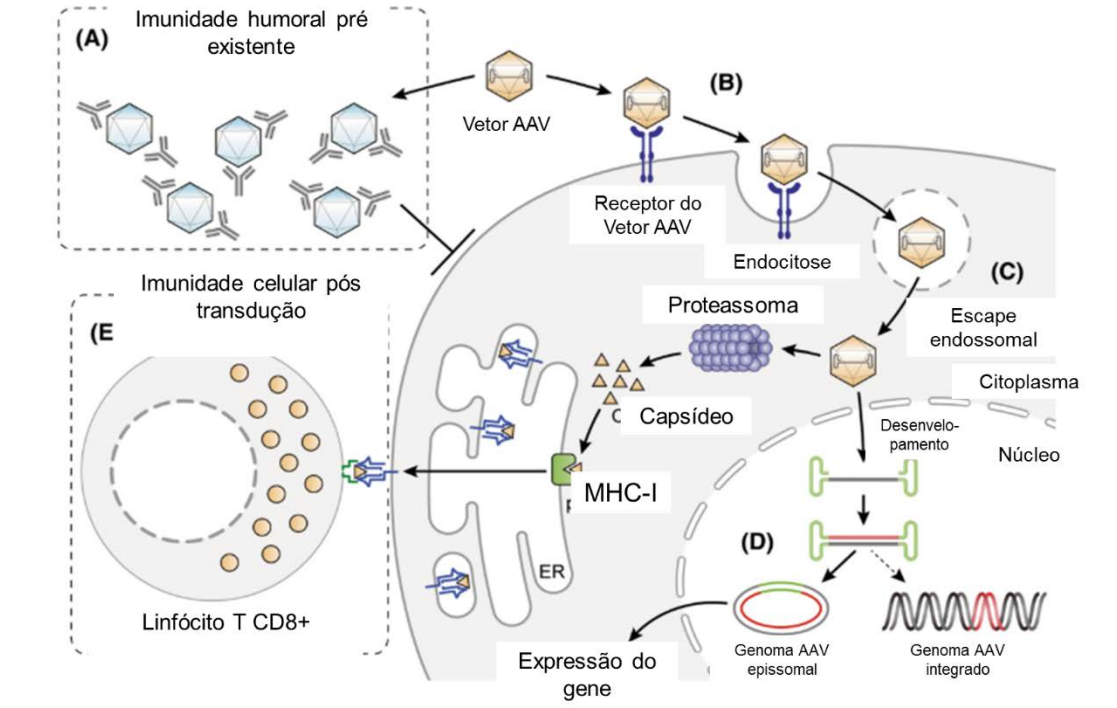
4.2.5.1 Vetor AAV

O AAV faz parte família do Parvovírus e é a opção utilizada na terapia gênica da hemofilia, pois não está relacionado a nenhuma patologia e possui baixa resposta imunológica comparado a outros vetores. A Figura 10 ilustra o mecanismo de ação de entrada e transdução do cDNA nos hepatócitos. Fase A: Anticorpos neutralizam o capsídeo do AAV. Fase B: Entrada do vetor AAV por endocitose. Fase C: Escape do endossomo para o núcleo. Fase D: Formação do Episssomo, geralmente não integrado ao genoma. Fase E: Degradação do capsídeo vetorial por linfócitos T CD8+ (*Clouster of Differention* 8) (OHMORI, 2018).

Outra característica do vetor de sorotipo AAV8 é a sua capacidade de expressão genética nas células do fígado quando invejado por via intravenosa. Entretanto, a técnica de terapia gênica utilizando vírus AAV possui a limitação quanto ao tamanho do gene inserido (4,5 – 5,0 kb) e a impossibilidade de realização na presença de anticorpos neutralizantes (OHMORI, 2018).

A estrutura do vetor selvagem consiste na cadeia simples de DNA que codifica dois genes. O gene *rep* é essencial para replicação do vírion e o gene *cap* para codificação de proteínas necessárias para o capsídeo viral. Quando o vetor é utilizado na terapia gênica, esses dois genes são perdidos e são inseridos o gene de interesse e o promotor para a transdução (LISOWSKI et al., 2014).

Figura 10: Representação da transdução gênica pelo vetor AAV..



Fonte: Adaptado de OHMORI, 2018.

4.2.5.2 Vetor LV

Os vetores LV são subclasses do vetor retroviral e possuem maior eficácia de transdução em células quiescentes como por exemplo as células tronco hematopoiéticas. Devido à esta característica, esses vetores são mais utilizados na terapia celular e possui ampla utilização para outras doenças como leucemias

e outras doenças hematopoiéticas. O vetor possui alto perfil de segurança e está sendo desenvolvido para a hemofilia (OHMORI, 2018).

Estudos clínicos demonstraram resultados promissores utilizando a terapia gênica. No estudo clínico de dose única, administração intravenosa, utilizando o AVV de sorotipo 5, os participantes que receberam a dose mais alta do vetor tiveram a atividade de FVIII aumentada para mais de 5 IU/ dl em apenas algumas semanas seguintes à administração do vetor e tiveram os valores de atividade FVIII normalizados (maiores de 50 IU/ dl) (KORTE; GRAF, 2018).

5. CONCLUSÕES

A revisão bibliográfica de artigos relacionados ao processo hemostático, fisiopatologia, aspectos genéticos e moleculares da Hemofilia A permitiram compreender o funcionamento das principais alternativas terapêuticas utilizadas no passado, presente e em desenvolvimento. A análise de novos tratamentos terapêuticos já estabelecidos no mercado ou em desenvolvimento para a doença possibilitou o entendimento dos mecanismos de ação de cada um deles os resultados clínicos proporcionado aos pacientes.

REFERÊNCIAS

AY, C. et al. Determinants of factor VIII plasma levels in carriers of haemophilia A and in control women. **Haemophilia.** v. 16, p. 11-117, 2010.

BALKARANSINGH P.; YOUNG G. Novel therapies and current clinical progress in hemophilia A. **Therapeutic Advances in Hematology**. Londres, v. 2, n. 2, p. 59-6, 2017.

BAUDO, F. et al. Management of bleeding in acquired hemophilia A: results from the European Acquired Haemophilia (EACH2) Registry. **Blood.** v. 130. p. 39-46. 2012.

CHAPIN, J.; HAJJAR, K. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. **Blood**. v. 29, n. 1, p. 17-24, 2015.

CHAUDHRY, R.; BABIKER, H. Physiology, Coagulation Pathways. **StatPearls Publishing LLC. 2019**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482253/>. Acesso em: 22 de abril de 2019.

CHEN, Y. et al. Genetic analysis of haemophilia A in Taiwan. **Haemophilia.** v. 16, n. 3, p. 538-544, 2010.

CHOWDARY, P. Inhibition of Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) as a Treatment for Haemophilia: Rationale with Focus on Concizumab. **Drugs**. v. 78, n. 9, p. 881-890, 2018.

COLLINS, P. et al. Diagnosis and treatment of factor VIII and IX inhibitors in congenital haemophilia: (4th edition). UK Haemophilia Centre Doctors Organization. **British Journal of Haematology.** v. 160, n. 2, p. 153-170, 2012.

DUTTA, D. et al. Accurate, simple, and inexpensive assays to diagnose F8 gene inversion mutations in hemophilia A patients and carriers. **Blood Advances.** v. 1, n. 3, p. 231-239, 2016.

FRANCHINI, M.; LIPPI, G. The use of desmopressin in acquired haemophilia A: a systematic review. **Blood Transfusion.** v. 9, n. 4, p. 377–382, 2011.

FRANCHINI, M.; MANNUCCI, P. Hemophilia A in the third millennium. **Blood Rev.** v. 27, n. 4, p. 174-184, 2013.

FRANCHINI, M.; MANNUCCI, P. Non-factor replacement therapy for haemophilia: a current update. **Blood Transfusion**. v. 16, n. 5, p. 457-461, 2018.

FRANCHINI, M.; MANNUCCI, P. Past, present and future of hemophilia: a narrative review. **Orphanet Journal of Rare Diseases.** v. 7, 2012.

GALE, A. Continuing education course #2: current understanding of hemostasis. **Toxicologic Pathology**. v. 39, n. 1, p. 273-280, 2010.

GIANGRANDE, P. et al. European principles of inhibitor management in patients with haemophilia. **Orphanet Journal of Rare Diseases**. v. 13, n. 1, p. 66, 2018.

HALL J. Hemostasis and blood coagulation. **Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology**. ed. 11, Philadelphia. Editora Elsevier Health Sciences. p. 457-9, 2010.

HOFBAUER, C. FVIII-binding IgG modulates FVIII half-life in patients with severe and moderate hemophilia A without inhibitors. **Blood**. v. 128, n. 2, p. 293-296, 2016.

INABA H., et al. Identification of deep intronic individual variants in patients with hemophilia A by next-generation sequencing of the whole factor VIII gene. **Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis**. v. 1, n. 2, p. 264-274, 2017.

KASHIWAKURA, Y. et al. Porcine Model of Hemophilia A. **PLoS One**. v. 7, n. 11, 2012.

KONKLE, B.; HUSTON, H.; FLETCHER, S. Hemophilia A. **GeneReviews®**, 2000. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1404/>. Acesso em: 23 de fevereiro de 2019.

KORTE, W.; GRAF, L. The Potential Close Future of Hemophilia Treatment – Gene Therapy, TFPI Inhibition, Antithrombin Silencing,and Mimicking Factor VIII with an Engineered Antibody. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**. v. 45, n. 2, p. 92-96, 2018.

LAURITZEN R. et. al. Administration of recombinant FVIIa (rFVIIa) to concizumab-dosed monkeys is safe, and concizumab does not affect the potency of rFVIIa in hemophilic rabbits. **Journal of Thrombosis and Haemostasis.** v.17, p. 460-469, 2019.

LEUER, M. et al. Somatic Mosaicism in Hemophilia A: A Fairly Common Event. **American Journal of Human Genetics.** v. 69, n.1, p. 75-87, 2001.

LISOWSKI, L. et al. Selection and evaluation of clinically relevant AAV variants in a xenograft liver model. **Nature**. v. 506, p.382-386, 2014.

LÖVGREN, K. et al. Non-genetic risk factors in haemophilia A inhibitor management - the danger theory and the use of animal models. **Haemophilia.** v. 22, n. 5, p. 657-666, 2016.

LU, Y. et al. Spectrum and origin of mutations in sporadic cases of haemophilia A in China. **Haemophilia**. v. 24, n. 2, p. 291-298, 2018.

MANCUSO, M.; SANTAGOSTINO, E. Outcome of Clinical Trials with New Extended Half-Life FVIII/IX Concentrates. **Journal of Clinical Medicine.** v. 6, n. 4, p. 39, 2017.

MANNUCCI, P. Miracle of haemophilia drugs: Personal views about a few main players. **Haemophilia.** v. 24, n. 4, p. 557-562, 2018.

MANNULLY, S.; RAMYA, L.; PULICHERLA, K. Perspectives on progressive strategies and recent trends in the production of recombinant human factor VIII. **International Journal of Biological Macromolecules.** v. 119, p. 496-504, 2018.

MCINTOSH, J. et al. Therapeutic levels of FVIII following a single peripheral vein administration of rAAV vector encoding a novel human factor VIII variant. **Blood.** v. 121, n. 17, p. 3335-3344, 2013.

MONROE, D.; HOFFMAN, M.; ROBERTS, H. Molecular biology and biochemistry of the coagulation factors and pathways of hemostasis. In: WILLIAMS, J. (Ed.). **Hematology**. New York: McGraw-Hill Professional Publishing, 2010. p. 614-616.

MULLINS, E. et al. Extended half-life pegylated, full-length recombinant factor VIII for prophylaxis in children with severe haemophilia A. **Haemophilia.** v. 13, n. 2, p. 238-246, 2016.

MUTO, A. et al. Anti-factor IXa/X bispecific antibody ACE910 prevents joint bleeds in a long-term primate model of acquired hemophilia A. **Blood**. v. 124, n. 20, p. 3165-3171, 2014.

OHMORI. T. Advances in gene therapy for hemophilia: basis, current status, and future perspectives. **International Journal of Hematology**. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12185-018-2513-4>. Acesso em: 19 de janeiro de 2019.

OLDENBURG, J. et al. Emicizumab Prophylaxis in Hemophilia A with Inhibitors. **The News England Journal of Medicine**. v. 377, n. 9, p. 809-818, 2017.

OLDENBURG, J.; PEZESHKPOOR, B.; PAVLOVA, A. Historical review on genetic analysis in hemophilia A. **Seminars in thrombosis and hemostasis.** v. 40, n. 8, p. 895-902, 2014.

PALTA S.; SAROA, R.; PALTA A. Overview of the coagulation system. Indian **Journal of Anaesthesia**. v. 58, n. 5, p. 515-523, 2014.

PASI, K. et al. Fitusiran, an Investigational RNAi Therapeutic Targeting Antithrombin for the Treatment of Hemophilia: Updated Results from a Phase 1 and Phase 1/2 Extension Study in Patients with Inhibitors. **Blood**. v. 128, n. 22, 2016.

PETERSON, J.; MARONEY, S.; MAST, A. Targeting TFPI for hemophilia treatment. **Thrombosis Research.** v. 141, n. 2, p. 28-30, 2016.

PEYVANDI, F.; GARAGIOLA, I. Product type and other environmental risk factors for inhibitor development in severe hemophilia A. **Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis**. v. 2, n. 2, p. 220-227, 2017.

PEYVANDI, F.; GARAGIOLA, I.; BIGUZZI, E. Advances in the treatment of bleeding disorders. **Journal of Thrombosis and Haemostasis.** v. 14, n. 11, p. 2095-2106, 2016.

POWELL, J. Longer-acting clotting factor concentrates for hemophilia. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. v. 13, n. 1, p. 167-175, 2015.

SAKURAI, Y.; TAKEDA, T. Acquired Hemophilia A: A Frequently Overlooked Autoimmune Hemorrhagic Disorder. **Journal of Immunology Research**. v. 2014. 2014.

SAMPEI, Z. et al. Identification and multidimensional optimization of an asymmetric bispecific IgG antibody mimicking the function of factor VIII cofactor activity. **PLoS One**. v. 8, n. 2, p. e57479, 2013.

SHARIPO A.; MITCHELL I.; NASR S. The future of bypassing agents for hemophilia with inhibitors in the era of novel agents. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. v. 16, n. 12, p. 2362-2374, 2018.

SHERMAN A.; BISWAS M.; HERZOG, M. Tolerance induction in hemophilia: innovation and accomplishments. **Current Opinion in Hematology.** v. 25, n. 5, p. 366-372, 2018.

SHERMAN, A.; BISWAS, M.; HERZOG, R. Innovative Approaches for Immune Tolerance to Factor VIII in the Treatment of Hemophilia A. **Frontiers in Immunology**. v. 8, 2017.

SHIMA, M. et al. Factor VIII–Mimetic Function of Humanized Bispecific Antibody in Hemophilia A. **The News England Journal of Medicine.** v. 374, n. 21, p. 2044-2053, 2016.

SRIVASTAVA, A. et al. Guidelines for the management of hemophilia. **Haemophilia.** v. 19, n. 1, p. 1-47, 2013.

TANTAWY, A. Molecular genetics of hemophilia A: Clinical perspectives. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**. v. 11, n. 2, p. 105-114, 2010.

VELZEN, A. et al. Intensity of factor VIII treatment and the development of inhibitors in non-severe hemophilia A patients: results of the INSIGHT case–control study. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. v. 15, n. 7, p. 1422-1429, 2017.

WANG X.; TERHORST C.; HERZOG R. In vivo Induction of Regulatory T Cells for Immune Tolerance in Hemophilia. **Cellular Immunology**. v. 301, p. 18-29, 2016.

Data e assinatura do aluno(a)

26 ABR

Data e assinatura do orientador(a)