UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Farmácia

Programa de Pós Graduação Em Análises Clínicas e Toxicológicas

João Henrique Fonseca de Moura

"DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE VON WILLEBRAND: comparação entre metodologia semi-automatizada (VWF:RCo) versus automatizada (VWF:GPIbM)".

Belo Horizonte

2025

João Henrique Fonseca de Moura

"DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE VON WILLEBRAND: comparação entre metodologia semi-automatizada (VWF:RCo) versus automatizada (VWF:GPIbM)".

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho.

Coorientador: Dr. Daniel Gonçalves Chaves

Belo Horizonte

2025

Moura, João Henrique Fonseca de.
M929d Diagnóstico da doença de von Willebrand [recurso eletrônico] : comparação entre metodologia semi-automatizada (VWF:RCo) versus automatizada (VWF:GPIbM) / João Henrique Fonseca de Moura. – 2025.
1 recurso eletrônico (67 f. : il.) : pdf

Orientadora: Maria das Graças Carvalho.
Coorientador: Daniel Gonçalves Chaves.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Doenças de von Willebrand – Teses. 2. Fator de von Willebrand – Teses. 3. Técnicas de laboratório clínico – Teses. 4. Ristocetina – Teses. I. Carvalho, Maria das Graças. II. Chaves, Daniel Gonçalves. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.15

Elaborado por Aline Guimarães Amorim – CRB-6/2292

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE FARMÁCIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

"DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE VON WILLEBRAND: COMPARAÇÃO ENTRE METODOLOGIA SEMI-AUTOMATIZADA (VWF:RCO) VERSUS AUTOMATIZADA (VWF:GPIbM)"

JOÃO HENRIQUE FONSÊCA DE MOURA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia dezenove de maio de dois mil e vinte e cinco, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores:

Silmara Aparecida de Lima Montalvão

UNICAMP

Leilismara Sousa Nogueira

UNIFAL

Rita Carolina Figueiredo Duarte

BIOCLIN - QUIBASA

Daniel Gonçalves Chaves - Coorientador
Independente

Maria das Graças Carvalho - Orientadora

UFMG

Belo Horizonte, 19 de maio de 2025.

Documento assinado eletronicamente por **Leilismara Sousa Nogueira**, **Usuária Externa**, em 21/05/2025, às 10:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Daniel Gonçalves Chaves**, **Usuário Externo**, em 21/05/2025, às 10:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Maria das Gracas Carvalho**, **Professora Magistério Superior - Voluntária**, em 24/05/2025, às 17:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Rita Carolina Figueiredo Duarte**, **Usuária Externa**, em 26/05/2025, às 12:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Silmara Aparecida de Lima Montalvão**, **Usuária Externa**, em 29/05/2025, às 09:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4225964** e o código CRC **2FE99842**.

Colaboradores

Beatriz Nogueira de Carvalho (Hemominas)

Thais Cristine Rodrigues Leonel (Siemens)

Laudislene Aparecida Cândido do Vale (Siemens)

Ana Flávia Pacheco dos Santos (Siemens)

Instituições Participantes

Fundação Hemominas

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais

Siemens Healthineers

Apoio Financeiro

Siemens Healthineers

CAPES

FAPEMIG

CNPq

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por me conceder força e sabedoria ao longo desta jornada.

À minha família, pelo apoio, paciência e incentivo, essenciais para a concretização deste trabalho. Aos meus pais, pelo exemplo de dedicação e pelo compromisso com a educação dos filhos, acompanhando cada etapa da nossa trajetória.

Aos mestres e colegas de trabalho que conheci ao longo da minha vida acadêmica e profissional, cujos ensinamentos e trocas de experiências foram essenciais para meu crescimento.

À Fundação Hemominas, pelo apoio e pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa.

À Beatriz Carvalho, gerente do laboratório de Hematologia da Fundação Hemominas, pelo incentivo, suporte e paciência ao longo do processo.

À equipe do laboratório de Hematologia, pela parceria e apoio constantes.

À equipe do Laboratório Central da Prefeitura de Belo Horizonte, pelo suporte, encorajamento e colaboração. Registro em especial, ao gerente do laboratório, Paulo Henrique Cordoval.

À professora Dra Maria das Graças Carvalho, minha orientadora, cuja dedicação, conhecimento e compromisso foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Daniel Gonçalves Chaves, coorientador, pelo suporte indispensável, especialmente no início do projeto, quando minha inexperiência demandava orientação e paciência.

Por fim, estendo meus sinceros agradecimentos a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A dosagem da atividade do Fator von Willebrand (VWF) tem sido um grande desafio, o que tem impacto na classificação correta da Doença de von Willebrand (DvW) e, consequentemente, no manejo e tratamento. Nas novas diretrizes da ISTH 2021 para diagnóstico de DvW há recomendação do uso de ensaios mais recentes (automatizados) para medir a atividade do VWF, em substituição ao ensaio do Cofator de Ristocetina (VWF:RCo), semi-automatizado. Nesse contexto, surge o kit INNOVANCE VWF Ac, totalmente automatizado, com potencialidade de inovação e adequação às novas recomendações e necessidades impostas para investigação e acompanhamento de pacientes com DvW. Assim, o objetivo do presente estudo foi comparar o desempenho analítico do kit INNOVANCE VWF Ac (método automatizado), em relação ao VWF:RCo (método semi-automatizado). Foram utilizadas 104 amostras de plasma de pacientes com DvW, além de 20 amostras de doadores de sangue aptos (controles), provenientes da Fundação Hemominas, Brasil. Dados dos participantes foram obtidos, tais como sexo, idade, raça e grupo sanguíneo ABO. Os métodos utilizados para dosagem do VWF foram VWF:RCo por agregometria, Kit INNOVANCE VWF Ac e Fator de von Willebrand Antígeno (VWF:Ag), ambos por turbidimetria. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Hemominas. A correlação de Spearman revelou uma forte associação entre os métodos INNOVANCE VWF Ac e VWF:RCo ($r=0,944$; $p<0,05$). Os métodos INNOVANCE VWF Ac e VWF:RCo demonstraram excelente concordância analítica (ICC = 0,953; IC95% = 0,900–0,974). O INNOVANCE VWF Ac apresentou mediana de atividade funcional significativamente superior (71,15% vs. 64,00%; $p < 0,0001$) e razão atividade/VWF:Ag próxima de 1, sugerindo melhor correspondência com a concentração antigênica. A reprodutibilidade do INNOVANCE VWF Ac foi superior, com menores coeficientes de variação nos controles normal (1,94%) e patológico (4,67%) em comparação ao VWF:RCo (9,54% e 12,66%, respectivamente). Os resultados sustentam a adoção do ponto de corte da razão INNOVANCE VWF Ac/VWF:Ag igual a 0,7, por conferir maior especificidade diagnóstica e reforçar a superioridade analítica do método automatizado. Portanto, justifica-se a substituição do método convencionalmente utilizado por um sistema moderno e automatizado.

Palavras chaves: doença de von Willebrand; fator de von Willebrand; diagnóstico laboratorial; cofator de ristocetina; INNOVANCE VWF Ac.

ABSTRACT

The measurement of von Willebrand Factor (VWF) activity has been a major challenge, impacting the correct classification of von Willebrand Disease (vWD) and, consequently, its management and treatment. The new 2021 ISTH guidelines for the diagnosis of vWD recommend the use of newer (automated) assays to measure VWF activity, replacing the semi-automated Ristocetin Cofactor (VWF:RCo) assay. In this context, the fully automated INNOVANCE VWF Ac kit emerges, with the potential for innovation and adaptation to the new recommendations and requirements imposed for the investigation and monitoring of patients with vWD. Therefore, the objective of this study was to compare the analytical performance of the INNOVANCE VWF Ac kit (automated method) with that of VWF:RCo (semi-automated method). A total of 104 plasma samples from patients with vWD were used, in addition to 20 samples from eligible blood donors (controls) from the Hemominas Foundation, Brazil. Participant data, including sex, age, race, and ABO blood group, were obtained. The methods used to measure VWF were VWF:RCo by aggregometry, INNOVANCE VWF Ac Kit, and von Willebrand Factor Antigen (VWF:Ag), both by turbidimetry. The study was approved by the Ethics Committee of the Hemominas Foundation. Spearman's correlation revealed a strong association between the INNOVANCE VWF Ac and VWF:RCo methods ($r=0.944$; $p<0.05$). The INNOVANCE VWF Ac and VWF:RCo methods demonstrated excellent analytical agreement (ICC = 0.953; 95% CI = 0.900–0.974). INNOVANCE VWF Ac showed a significantly higher median functional activity (71.15% vs. 64.00%; $p < 0.0001$) and an activity/VWF:Ag ratio close to 1, suggesting better correspondence with antigen concentration. INNOVANCE VWF Ac reproducibility was superior, with lower coefficients of variation in normal (1.94%) and pathological (4.67%) controls compared to VWF:RCo (9.54% and 12.66%, respectively). The results support the adoption of the INNOVANCE VWF Ac/VWF:Ag ratio cutoff point of 0.7, as it confers greater diagnostic specificity and reinforces the analytical superiority of the automated method. Therefore, replacing the conventionally used method by a modern and automated system is justified.

Keywords: von Willebrand disease; von Willebrand factor; laboratory diagnosis; ristocetin cofactor; INNOVANCE VWF Ac.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação esquemática do VWF, destacando sua organização multimérica, domínios funcionais e principais sítios de interação, incluindo ligações ao colágeno, FVIII, plaquetas e o local de clivagem pela enzima ADAMTS13.....15

Figura 2 Fisiopatologia da doença de von Willebrand – defeitos quantitativos...17

Figura 3 Fisiopatologia da doença de von Willebrand – defeitos qualitativos.....17

Figura 4 Algoritmo proposto para o diagnóstico da doença de von Willebrand..19

Figura 5 Ensaio Turbidimétrico Kit INNOVANCE VWF Ac Siemens.....28

Figura 6 Ensaio agregométrico VWF:RCo.....29

Figura 7 Ensaio turbidimétrico VWF:Ag.....30

Figura 8 Comparação dos resultados dos testes VWF:RCo, INNOVANCE VWF Ac, VWF:Ag e FVIII.....33

Figura 9 Comparação dos resultados das relações VWF:RCo/VWF:Ag e INNOVANCE VWF Ac/VWF:Ag.....34

Figura 10 Relação entre os ensaios VWF:RCo e INNOVANCE VWF Ac: análise por gráfico de dispersão.....35

Figura 11 Resultados paciente 1.....38

Figura 12 Resultados paciente 2.....38

Figura 13 Resultados paciente 3.....39

Figura 14 Relação VWF:RCo/VWF:Ag 0,6 X Relação INNOVANCE VWF Ac/VWF:Ag 0,6.....40

Figura 15 Relação VWF:RCo/VWF:Ag 0,7 X Relação INNOVANCE VWF Ac/VWF:Ag 0,7.....41

Figura 16 Relação VWF:RCo/VWF:Ag 0,6 X Relação INNOVANCE VWF Ac/VWF:Ag 0,7.....41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Características clínicas, laboratoriais e padrões de herança dos tipos de doença de von Willebrand.....18

Tabela 2 Caracterização dos pacientes/controles admitidos na Fundação Hemominas.....32

Tabela 3 Valores medianos (Q1-Q3) obtidos para os testes VWF:RCo, INNOVANCE VWF Ac, VWF:Ag e FVIII.....33

Tabela 4 Valores medianos (Q1-Q3) para as relações entre os métodos de atividade (INNOVANCE VWF Ac e VWF:RCo) e o método de VWF:Ag e para a relação FVIII/ VWF:Ag.....33

Tabela 5 Teste de Imprecisão do ensaio INNOVANCE VWF Ac durante o período de 3 dias.....36

Tabela 6 Histórico de imprecisão do ensaio VWF:RCo.....36

Tabela 7 Resultados das comparações, expressos como mediana, entre os métodos VWF:RCo, INNOVANCE VWF Ac e VWF:Ag considerando os grupos sanguíneos “O” e não “O”.....37

Tabela 8 Resultados das comparações expressos como mediana entre os métodos VWF:RCo, INNOVANCE VWF Ac, VWF:Ag e FVIII por faixa etária.....37

Tabela 9 Pontos de corte para as relações VWF:RCo/VWF:Ag e VWF:RCo/ INNOVANCE VWF Ac/ VWF:Ag.....40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASH	*American Society of Hematology*
BAT	*Bleeding Assessment Tool*
CN	Controle Normal
CP	Controle Patológico
CV%	Coeficiente de Variação
DDAVP	Desmopressina
DvW	Doença de von Willebrand
VWF	Fator de von Willebrand
VWF:Ag	Fator de von Willebrand Antígeno
VWF:CB	Ligação do VWF ao colágeno
VWF:RCo	Ensaio do Cofator de Ristocetina
FVIII	Fator VIII da coagulação
GPIb	Glicoproteína IbReceptor plaquetário
VWF:GP1bM	Ensaio de atividade do VWF que usa fragmentos mutantes de GPIb com ganho de função
ICC	Índice de correlação Intraclasse para concordância
ISTH	*International Society on Thrombosis and Haemostasis*
NHF	*National Hemophilia Foundation*
PPN	*Pool* de Plasma Normal
PPP	*Pool* de Plasma Patológico
Q1	1º quartil
Q3	3º quartil
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

INNOVANCE VWF Ac	Ensaio laboratorial para medir a atividade do fator de von Willebrand (VWF) no sangue
SPSS	*Statistical Package for Social Science*
WFH	*World Federation of Hemophilia*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....14

2 OBJETIVOS.....24

3 MATERIAIS E MÉTODOS.....25

4 RESULTADOS.....31

5 DISCUSSÃO.....42

6 CONCLUSÕES.....47

7 PERSPECTIVA DE ESTUDOS COMPLEMENTARES.....48

REFERÊNCIAS.....49

Anexo A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Anexo B - APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FUNDAÇÃO HEMOMINAS

Anexo C – *ABSTRACT* ENVIADO PARA O ISTH 2025

Anexo D - ISTH 2025: NOTIFICAÇÃO DE ACEITAÇÃO DE RESUMO - APRESENTAÇÃO EM PÔSTER

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A Doença de von Willebrand (DvW), uma disfunção da hemostasia causada por deficiência quantitativa ou qualitativa do fator de von Willebrand, é o distúrbio hemorrágico hereditário mais comum (FAVALORO e PASALIC, 2023). Estudos relatam que aproximadamente 1% da população pode ter níveis reduzidos do fator von Willebrand, mas apenas 0,1% apresenta sintomas clínicos de sangramento (BOWMAN *et al*., 2010). De acordo com o relatório Annual Global Survey 2023 da Federação Mundial de Hemofilia, até o ano de referência foram registrados 101.128 indivíduos diagnosticados com DvW em todo o mundo, dos quais 11.370 estão localizados no Brasil.

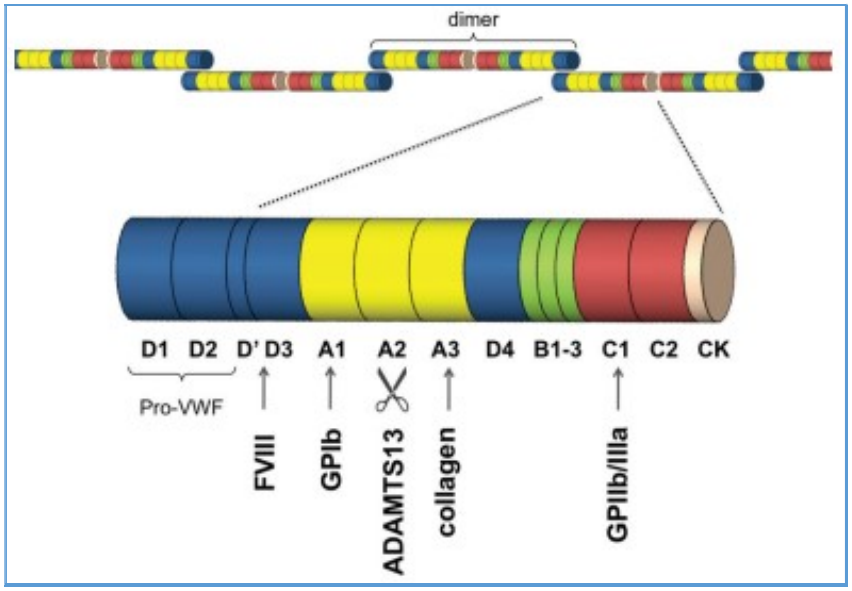
Entre os sintomas mais comuns estão sangramentos mucocutâneos como epistaxes (sangramentos nasais), sangramentos gengivais, menorragia (sangramento menstrual excessivo) e sangramento prolongado após procedimentos dentários ou cirúrgicos. Em casos graves, sangramentos articulares semelhantes aos da hemofilia podem ocorrer, especialmente na doença de von Willebrand tipo 3 (LAK *et al*., 2000; FOOD *et al*., 2010).

A DvW foi primeiramente descrita em 1926 pelo médico finlandês Dr. Erik von Willebrand, que documentou o caso de uma família oriunda das ilhas costeiras da Finlândia, o qual observou que homens e mulheres eram afetados pela doença diferentemente da hemofilia, que tende a afetar principalmente homens. Essa observação levou à ideia de que a DvW tinha um padrão hereditário diferente da hemofilia, cujo distúrbio foi, a princípio, chamado de "pseudo-hemofilia" (FEDERIC *et al*., 2006). A doença segue um padrão de herança autossômica dominante (predominante) ou recessiva, não relacionado aos cromossomos ligados ao sexo (FOGARTY *et al*., 2020)

O fator de von Willebrand (VWF) é uma glicoproteína composta por diversas subunidades, formando uma estrutura multimérica e é sintetizado nas células endoteliais e nos megacariócitos. Após a síntese, o VWF é armazenado em compartimentos especializados chamados corpos de Weibel-Palade nas células endoteliais e grânulos alfa nos megacariócitos. Multímeros de diversos tamanhos são formados e os de alto peso molecular são os mais ativos hemostaticamente. Há vários domínios funcionais no VWF e cada um desses domínios interage com

componentes específicos, como o colágeno nos domínios A1 e A3, o FVIII nos domínios D' e D3 e as plaquetas por meio da glicoproteína GP1b no domínio A1 (SADLER *et al.*, 2006) (Figura 1).

Figura 1. Representação esquemática do VWF, destacando sua organização multimérica, domínios funcionais e principais sítios de interação, incluindo ligações ao colágeno, FVIII, plaquetas e o local de clivagem pela enzima ADAMTS13.



Fonte: DE MEYER *et al.*, 2012.

O fator de von Willebrand (VWF) exerce um papel essencial na hemostasia, atuando tanto na adesão plaquetária quanto na estabilização da coagulação. A participação do VWF nos dois modelos da coagulação é descrita conforme segue. No modelo clássico da coagulação, tradicionalmente utilizado para fins didáticos, o VWF participa da hemostasia primária ao mediar a adesão das plaquetas ao colágeno subendotelial no local da lesão vascular, formando uma ponte crucial para a iniciação do processo hemostático. Além disso, na hemostasia secundária, o VWF desempenha um papel fundamental na estabilização do fator VIII (FVIII), prolongando sua meia-vida e favorecendo sua participação na cascata de coagulação para a geração do coágulo de fibrina (SADLER et al., 2006).

No modelo celular (modelo atual), que representa de forma mais dinâmica e fisiológica a coagulação, o VWF mantém sua função central ao conectar a adesão plaquetária à geração de trombina. Ele facilita a ancoragem das plaquetas ao sítio

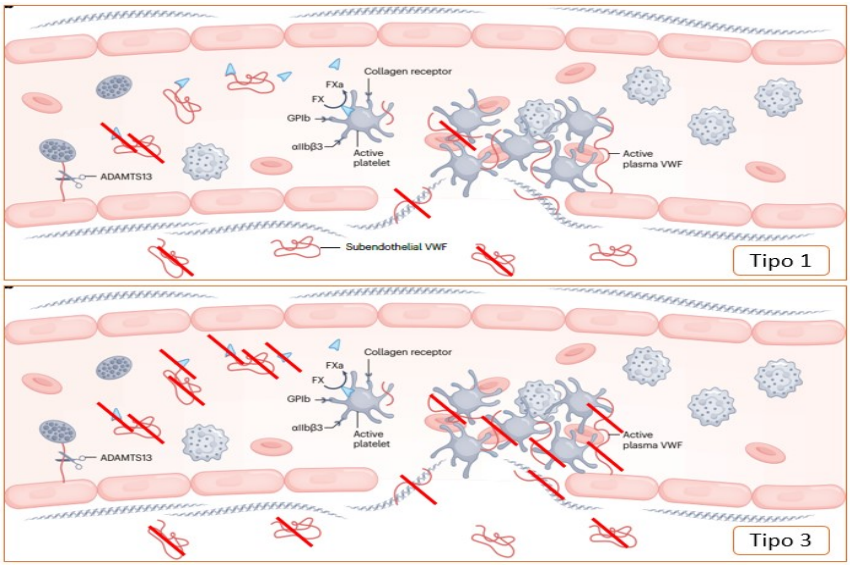
da lesão e garante a disponibilidade do FVIII na superfície plaquetária ativada, promovendo a amplificação da resposta hemostática. Esse mecanismo potencializa a propagação da coagulação e a produção eficiente de trombina, assegurando a formação de um coágulo estável e funcional (FERREIRA et al., 2010). Dessa forma, o VWF é um componente-chave na interação entre as células e os fatores plasmáticos, regulando a resposta hemostática de maneira coordenada.

O diagnóstico da doença de von Willebrand (DvW) baseia-se em uma combinação de histórico clínico de sangramentos, histórico familiar e resultados laboratoriais que evidenciam anomalias no VWF e no FVIII. A avaliação clínica inicia-se com um levantamento detalhado dos sintomas hemorrágicos do paciente e de seus familiares, sendo que a classificação da gravidade desses sintomas tem se aprimorado com o uso de ferramentas de avaliação do sangramento baseadas em questionários estruturados, como o *Bleeding Assessment Tool* (BAT), endossadas pela Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia (ISTH). No entanto, essas ferramentas possuem limitações diagnósticas, especialmente em crianças, devido à sua dependência da idade e da exposição anterior a desafios hemostáticos, o que pode comprometer sua precisão. O diagnóstico laboratorial da DvW inicial envolve a medição do antígeno do VWF, da atividade do VWF, e da atividade coagulante do FVIII. Testes adicionais como ligação do VWF ao colágeno (VWF:CB), dosagem de multímeros e testes genéticos podem ser necessários para ajudar na classificação da doença (LEEBEEK; EIKENBOOM, 2016).

A DvW é classificada em três tipos principais com base nas características quantitativas e qualitativas do VWF, cada um associado a mecanismos e gravidades distintas. O Tipo 1, responsável por cerca de 70-80% dos casos, é caracterizado por uma redução parcial na quantidade de VWF funcional no plasma, geralmente levando a sintomas leves a moderados de sangramento, como epistaxes frequentes, hematomas e sangramentos prolongados após lesões ou cirurgias. O Tipo 2, que corresponde a cerca de 20-25% dos casos, apresenta anomalias qualitativas do VWF e é subdividido em quatro variantes: 2A, quando há uma perda de multímeros de alto peso molecular, fundamentais para a adesão plaquetária; 2B, caracterizado por uma afinidade aumentada do VWF pelas plaquetas, resultando em trombocitopenia induzida; 2M, relacionado a um defeito funcional no VWF sem perda de multímeros; e 2N, associado a uma ligação reduzida entre o VWF e o FVIII,

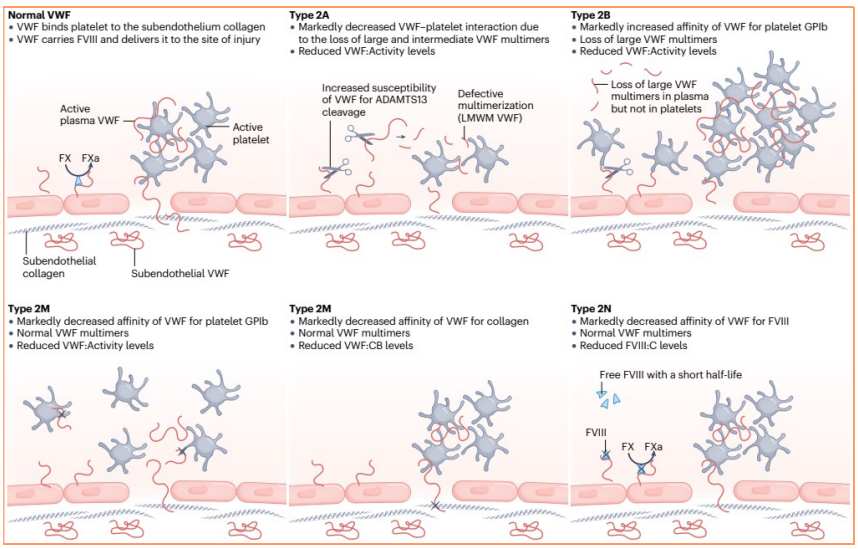
levando a baixos níveis plasmáticos deste último e sintomas que podem se assemelhar à hemofilia A leve. Já o Tipo 3, a forma mais rara e grave, é marcado pela ausência quase completa de VWF no plasma e nas plaquetas, causando manifestações hemorrágicas graves, como hemorragias espontâneas em articulações e tecidos moles. Essa classificação é essencial para um diagnóstico preciso e para a escolha do tratamento adequado, o que implica na disponibilidade e utilização de testes laboratoriais detalhados que avaliem a concentração, estrutura e funcionalidade do VWF (SADLER *et al.*, 2006; LEEBEEK; EIKENBOOM, 2016) (Figuras 2, 3 e 4 e Tabela 1).

Figura 2. Fisiopatologia da doença de von Willebrand – defeitos quantitativos



Fonte: Adaptado de Seidizadeh, O *et al.*,2024.

Figura 3. Fisiopatologia da doença de von Willebrand – defeitos qualitativos



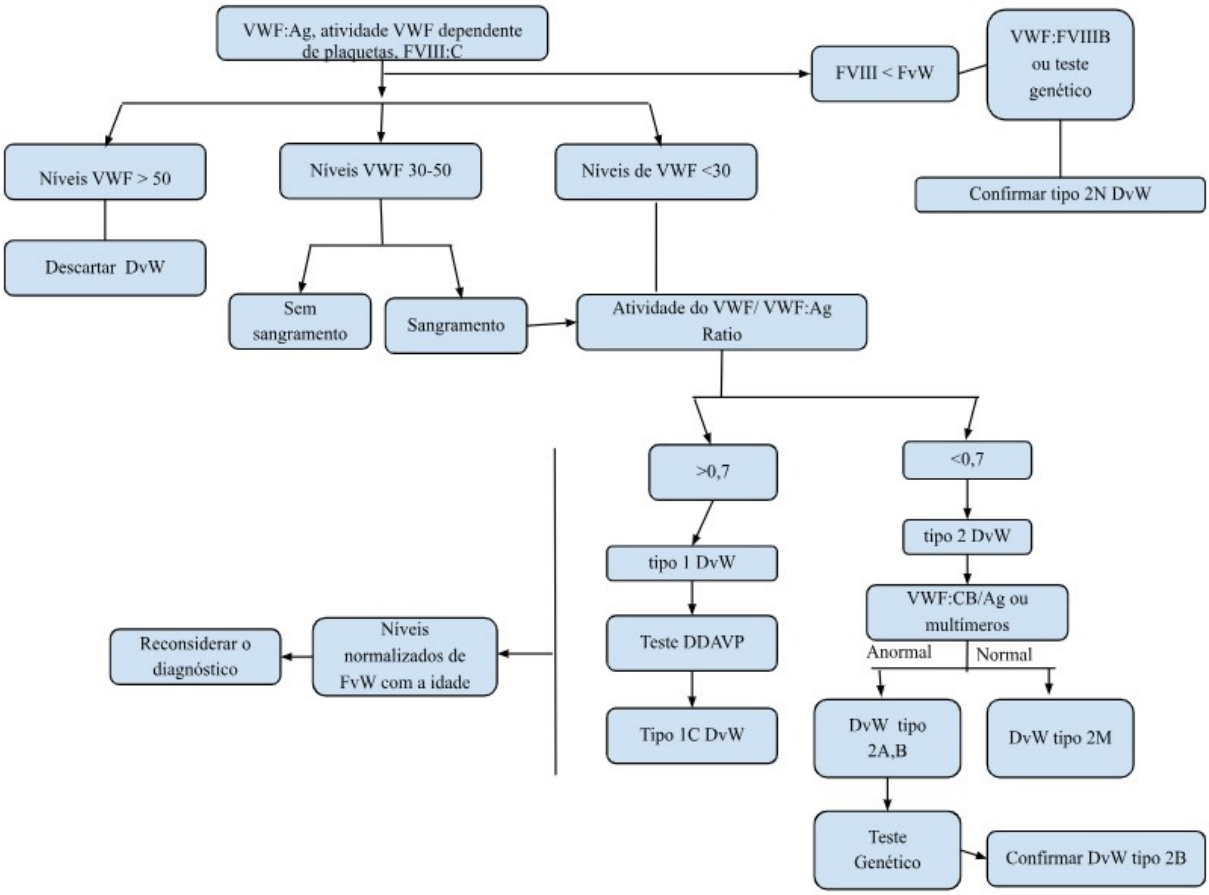
Fonte: Seidizadeh, O *et al.*,2024.

Tabela 1. Características Clínicas, Laboratoriais e Padrões de Herança dos Tipos de Doença de von Willebrand

Tipo	Definição	Padrão Hereditário	Gravidade de Sangramento	Achados Laboratoriais
Tipo 1 (≈75%)	Redução quantitativa parcial do VWF.	Autossômica dominante	Leve a moderada	Diminuição proporcional do VWF:Ag, VWF:RCo (ou VWF:GPIbM) e FVIII. Relação VWF:RCo/VWF:Ag geralmente normal (>0,7).
Tipo 2A (10 a 20%)	Redução qualitativa com deficiência de multímeros de alto peso molecular.	Autossômica dominante*	Leve a moderada	VWF:Ag normal ou levemente diminuído, VWF:RCo mais reduzido. Relação VWF:RCo/VWF:Ag baixa (<0,7).
Tipo 2B (≈5%)	Aumento da afinidade do VWF para GPIb, causando remoção de multímeros de alto peso molecular.	Autossômica dominante	Leve a moderada (mais trombocitopenia).	VWF:Ag normal ou levemente diminuído, VWF:RCo muito reduzido. Relação VWF:RCo/VWF:Ag baixa (<0,7). Multímeros anormais.
Tipo 2M	Alteração qualitativa com redução da interação com GPIb, mas com multímeros normais.	Autossômica dominante*	Leve a moderada	VWF:Ag normal ou levemente diminuído, VWF:RCo mais reduzido. Relação VWF:RCo/VWF:Ag baixa (<0,7). Multímeros normais.
Tipo 2N	Diminuição da afinidade do VWF para o fator VIII.	Autossômica recessiva	Sangramento semelhante à hemofilia A	VWF:Ag normal, VWF:RCo normal ou levemente reduzido, FVIII muito reduzido. Relação FVIII/VWF:Ag baixa.
Tipo 3 (incomum)	Deficiência quase total de VWF.	Autossômica recessiva	Grave (sangramento grave e espontâneo)	VWF:Ag e VWF:RCo indetectáveis ou muito baixos. FVIII muito reduzido (<10%).
Adquirida (incomum)	Deficiência adquirida de VWF, geralmente associada a condições como doenças autoimunes ou neoplasias.	Não hereditária	Variável, dependendo da causa subjacente	Resultados laboratoriais similares aos tipos 1 ou 2, dependendo da apresentação.

Fonte: (SADLER *et al.*, 2006; JAMES *et al*, 2021)

Figura 4. Algoritmo proposto para o diagnóstico da doença de von Willebrand



O tratamento da DvW é adaptado ao tipo e à gravidade da doença, considerando manifestações clínicas específicas. Para o Tipo 1, que geralmente é leve, o uso de desmopressina (DDAVP) é eficaz na maioria dos casos, pois estimula a liberação de VWF armazenado no endotélio; entretanto, sua eficácia deve ser avaliada individualmente. No Tipo 2, o manejo depende do subtipo: enquanto o DDAVP pode ser útil em alguns casos de 2A e 2M, é contraindicado no subtipo 2B, onde pode exacerbar a trombocitopenia; nesses casos, o uso de concentrados de fatores de coagulação contendo VWF e FVIII é preferido. Para o subtipo 2N, devido à deficiência de ligação ao FVIII, reposição de concentrados ricos em VWF também é necessária. O Tipo 3, a forma mais grave da DvW, exige reposições frequentes de concentrados de VWF/FVIII para controle de sangramentos e prevenção de complicações hemorrágicas, especialmente em cirurgias. Além desses tratamentos, há tratamentos adjuvantes, como antifibrinolíticos (ácido tranexâmico ou ácido ε-aminocaproico), são úteis para reduzir sangramentos mucosos. O manejo deve ser individualizado, baseado em testes laboratoriais e resposta terapêutica (SADLER *et al.*, 2006; LEEBEEK; EIKENBOOM, 2016).

O DDAVP é um análogo sintético da vasopressina que exerce sua ação por meio de receptores específicos localizados nos rins e nas células endoteliais dos vasos sanguíneos. No âmbito hematológico, sua principal relevância está relacionada ao efeito sobre as células endoteliais. O DDAVP promove a liberação de estoques pré-formados do VWF, armazenados nos corpos de Weibel-Palade dessas células. Como resultado, ocorre um aumento transitório dos níveis plasmáticos de VWF. Devido a essa propriedade, o DDAVP é amplamente utilizado como agente terapêutico na modulação dos níveis de VWF, sendo especialmente eficaz no manejo de distúrbios hemorrágicos leves.

A responsividade ao DDAVP (teste de DDAVP) é amplamente avaliada pelo aumento significativo dos níveis plasmáticos de FVIII e do VWF:Ag. Segundo estudos clássicos, um indivíduo é considerado responsivo quando, uma hora após a infusão, os níveis plasmáticos de FVIII e VWF:Ag atingem, no mínimo, duas a três vezes os valores basais, desde que ambos ultrapassem 30% dos níveis normais (LEISSINGER *et al*., 2013; WEYAND e FLOOD, 2021).

De forma geral, pacientes com DvW que respondem ao DDAVP apresentam elevação concomitante dos níveis de VWF:Ag e da atividade funcional medida VWF:RCo (FEDERICI; CASTAMAN; MANNUCCI, 2002).

Na DvW tipo 1C (Vicenza), observa-se um padrão característico de rápida depuração do VWF. Para o teste usa-se colher o sangue antes de administrar DDAVP, 1 horas após e 4 horas após administrar. Estudos indicam que essa variante é marcada por um decréscimo superior a 30% nos níveis plasmáticos de VWF em relação ao pico alcançado uma hora após a infusão de DDAVP, o que está relacionado à alta taxa de depuração do VWF devido a mutações específicas no gene *VWF* (JAMES *et al*, 2021). Esse comportamento pode comprometer a eficácia do DDAVP como terapêutica isolada em eventos hemorrágicos, demandando o uso de concentrados de VWF em cenários clínicos críticos.

Uma ampla gama de níveis de VWF pode ser observada na população em geral e existem vários genes que afetam os níveis desse fator, com a maior influência genética proveniente do gene do grupo sanguíneo ABO. Indivíduos com grupo sanguíneo “O” têm o nível do VWF 20 a 30% mais baixo do que indivíduos com outro grupo sanguíneo não “O” (O’DONNELL *et al.*, 2002; MURRAY *et al.*, 2019;

WARD *et al.*, 2020). Outro fator influenciador é que os níveis de VWF aumentam com a idade (MOHAMMED e FAVALORO, 2017; FOGARTY *et al*., 2020), o que pode complicar o diagnóstico de DvW em pacientes mais idosos. Indivíduos que foram diagnosticados na juventude podem apresentar níveis normais de VWF na terceira idade, o que levanta questões sobre a continuidade do diagnóstico e a necessidade de acompanhamento individualizado ao longo da vida (JAMES *et al*, 2021).

Uma fração substancial da variação no VWF não é herdada e está relacionada à atividade inflamatória. Os níveis de VWF mostram um rápido e forte aumento consequente à reação de fase aguda de processos inflamatórios, o que dificulta a detecção da DvW leve na presença de estresse ou inflamação (CASTAMAN e LINARI, 2021).

Adicionalmente, níveis plasmáticos cronicamente elevados de VWF, frequentemente resultantes de ativação ou disfunção endotelial, estão associados a doenças cardiovasculares, incluindo maior risco de doença cardíaca isquêmica e acidente vascular cerebral (HORIUCHI *et al*., 2019; REARDON *et al*., 2021). O VWF também está implicado em outras condições clínicas, como predisposição à trombose, elevações em doenças inflamatórias e até correlações com metástases em certos tipos de câncer, angiogênese e aterosclerose (ABOU-ISMAIL *et al*., 2023).

Essas múltiplas funções e interações do VWF destacam a complexidade de determinar sua função e níveis no organismo. Entender essas nuances é essencial para aprimorar o diagnóstico, manejo e tratamento das condições relacionadas à DvW.

Nos pacientes com DvW que serão submetidos a cirurgia, cumpre ressaltar que um diagnóstico correto permite tratamento profilático direcionado para prevenir o risco de sangramento com potencial para reduzir significativamente a necessidade de transfusões sanguíneas. No entanto, a confirmação do diagnóstico da DvW requer, além de uma avaliação clínica apropriada, metodologias altamente específicas que ainda não estão amplamente disponíveis nos laboratórios clínicos, mesmo naqueles especializados em hemostasia. Esta constatação vem reforçar a necessidade de envidar esforços para superar esta limitação, o que impactará positivamente no diagnóstico da DvW permitindo decisões clínicas mais assertivas. Ressalta-se que a

terapia sob demanda é a base do tratamento na DvW, embora a profilaxia de longo prazo esteja surgindo para aqueles com sangramento recorrente e grave. Concentrados de VWF/FVIII, VWF recombinante e DDAVP estão entre as escolhas terapêuticas mais utilizadas na DvW.

Sabe-se que a dosagem do VWF tem sido um grande desafio, principalmente nos países em desenvolvimento o que, indubitavelmente, tem impacto na classificação correta da DvW e, consequentemente, no manejo e tratamento dos pacientes (BOENDER *et al*., 2018).

Novos *guidelines* para diagnóstico da DvW têm surgido em congressos e na literatura específica (JAMES *et al.,* 2021; FAVALORO e PASALIC, 2023), fato que vem motivar a realização do presente estudo, cujos resultados poderão ter posterior aplicação prática em Centros de Hemoterapia, como a Hemominas, bem como em laboratórios de Análises Clínicas especializados em Hemostasia, trazendo benefícios aos pacientes.

Um dos maiores desafios no diagnóstico da DvW é que o ensaio de VWF:RCo tradicionalmente utilizado, apresenta alta variabilidade, baixa sensibilidade e pode ser influenciado por variantes genéticas. Uma variante comum, PD1472H, presente em aproximadamente 50% dos negros (afro-americanos) e em 20% dos caucasianos, pode levar a uma redução na razão VWF:RCo/VWF:Ag. Porém, essa diminuição não está associada a sintomas hemorrágicos, sendo caracterizada como um artefato de ensaio. Isso pode resultar em falsos positivos para a DvW, diagnosticando erroneamente indivíduos saudáveis como DvW tipo 2, por exemplo (FLOOD *et al*, 2010; BODÓ *et al*., 2015).

De acordo com a literatura, o ensaio da atividade do VWF, VWF:GP1bM, apresenta menor variabilidade, maior sensibilidade e maior precisão, além de não ser influenciado por variantes genéticas, como a PD1472H, o que contribui para a melhoria da acurácia diagnóstica da DvW (BODÓ *et al*., 2015; BOENDER *et al*., 2018). Um exemplo deste ensaio, disponível comercialmente, é o INNOVANCE VWF Ac**,** um método automatizado que oferece maior conveniência, precisão e sensibilidade para o diagnóstico, favorecendo o manejo clínico dos distúrbios hemorrágicos quando implementado no serviço laboratorial. O ensaio INNOVANCE VWF Ac mede diretamente a aglutinação mediada pelo receptor GPIb, dependente

do VWF, utilizando uma proteína recombinante com duas mutações de ganho de função naturalmente associadas à DvW. Dessa forma, o uso da ristocetina, tradicionalmente necessária para ativação do domínio A1 do VWF em ensaios convencionais, torna-se dispensável, enquanto a introdução do ensaio INNOVANCE VWF Ac promete maior eficiência ao processo diagnóstico.

Ressalta-se que nas novas diretrizes ISTH 2021 para diagnóstico de DvW há recomendação do uso de ensaios mais recentes (automatizados) para medir a atividade do VWF, em substituição ao ensaio VWF:RCo semi-automatizado. Dessa forma, o presente estudo surgiu sob a perspectiva de inovação e adequação do laboratório de Hematologia da Fundação Hemominas às novas recomendações e necessidades impostas para investigação e acompanhamento de pacientes com DvW.

O teste INNOVANCE VWF Ac foi selecionado para o presente estudo comparativo não apenas por suas potenciais vantagens analíticas, mas também por aspectos operacionais relevantes. À época da realização do estudo, a plataforma analítica disponível na Fundação Hemominas era fornecida pela mesma empresa responsável pelo ensaio INNOVANCE, o que favoreceu a viabilidade técnica da execução. Ademais, o interesse institucional em validar metodologias mais modernas partiu da própria Fundação Hemominas, considerando que a validação de um teste alternativo, não compatível com a estrutura já instalada, implicaria em maiores obstáculos operacionais, financeiros e regulatórios.

É importante destacar que, além do ensaio INNOVANCE VWF Ac, outras metodologias automatizadas de avaliação da atividade do VWF vêm sendo desenvolvidas, com destaque para a técnica VWF:GPIbR, que também mede a interação funcional do VWF com o receptor plaquetário GPIb, ainda que utilizando diferentes princípios de ativação (JAMES *et al*, 2021). Essas alternativas refletem os avanços contínuos na busca por métodos mais padronizados, sensíveis e reprodutíveis no diagnóstico laboratorial da DvW.

Nesse contexto, o presente estudo ao utilizar o kit INNOVANCE VWF Ac pretende contribuir para obter uma melhor avaliação e familiarização com esta nova metodologia, comparando seu desempenho ao teste que já é rotineiramente empregado na Fundação Hemominas. Espera-se que tal iniciativa possa trazer

benefícios no diagnóstico da DvW visando posterior implantação do kit INNOVANCE VWF Ac na Fundação Hemominas e outros Hemocentros.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Comparar o desempenho analítico de ensaios de diagnóstico de pacientes com DvW, automatizado e semi-automatizado.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar o desempenho analítico do kit comercial INNOVANCE VWF Ac baseado na ligação do VWF à GPIb recombinante (VWF:GPIbM) em comparação com o ensaio VWF:RCo.
- Comparar a relação dos testes INNOVANCE VWF Ac e VWF:RCo frente ao Fator de von Willebrand Antígeno (VWF:Ag);
- Avaliar o ganho de produtividade com a automação do teste para diagnóstico da DvW;
- Verificar a consistência de que indivíduos com grupo sanguíneo “O” apresentam níveis de VWF mais baixos em relação àqueles de grupos sanguíneos não “O”;
- Verificar a consistência do aumento dos níveis de VWF com a progressão da idade;
- Comparar o padrão de resposta das curvas de DDAVP em diferentes intervalos de tempo (antes, 1 hora após e 4 horas após a administração do medicamento) por meio dos testes de VWF:RCo, do ensaio INNOVANCE VWF Ac e da dosagem do VWF:Ag, com o intuito de verificar a variabilidade (principalmente dos testes INNOVANCE VWF Ac e VWF:RCo) nas respostas dos pacientes ao tratamento com DDAVP;
- Comparar os pontos de corte 0,6 e 0,7 para a relação de Atividade VWF/VWF:Ag utilizando os dois métodos INNOVANCE VWF Ac e VWF:RCo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

Foi utilizada uma amostra de conveniência constituída por 124 amostras de plasma incluindo 20 amostras de doadores de sangue aptos (controles) (10 homens e 10 mulheres de grupos sanguíneos “O” e “não O”), faixa etária de 18 a 60 anos, além de 104 amostras de pacientes sabidamente com DvW (em uso ou não de DDAVP) ou em investigação de doença hemorrágica, em qualquer faixa etária. Indivíduos controles ou pacientes, diante de qualquer sintomatologia que pudesse ser atribuída à infecção e/ou processo inflamatório, não foram puncionados para obtenção de amostras de sangue.

Foram coletados 2 tubos de sangue (5,4 mL) dos pacientes e controles por meio de punção venosa, em tubos estéreis contendo citrato de sódio (3,2%) pelo sistema Vacutainer® (Becton-Dickinson Bioscience). As amostras foram processadas em centrífuga refrigerada a 20ºC, 3000 RPM durante 10 minutos, para separação do plasma e, em seguida, aliquotadas em tubos identificados, os quais foram armazenados a uma temperatura de – 30°C até o momento do uso.

Para a coleta das amostras de pacientes ambulatoriais incluídos no estudo da Fundação Hemominas houve uma solicitação de dispensa de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) por parte do responsável por esse estudo. Tal solicitação se fundamentou com base na Resolução 466/2012, e teve como principal justificativa o fato de se tratar de um estudo analítico, sendo que a aplicação do TCLE aumentaria os riscos de quebra de confidencialidade. As amostras de pacientes foram utilizadas de forma anônima. Além disso, foram adotadas medidas para minimizar o risco de quebra de confidencialidade, já que só integrantes do presente estudo estavam envolvidos diretamente e cientes dos cuidados.

Quanto às amostras de doadores, foi reconhecida a necessidade de aplicação do TCLE, uma vez que houve identificação dos participantes e de coleta exclusiva para o estudo. Assim sendo, foi aplicado o TCLE aos doadores antes da coleta das amostras.

O projeto em pauta, em sua concepção, envolvia apenas a comparação analítica entre métodos diagnósticos para a atividade de VWF. Porém, em um dado momento, devido à sua importância e potencial de aplicação, o referido estudo se transformou em um projeto de dissertação de mestrado. Assim, após várias discussões entre os colaboradores envolvidos, foi aventada a possibilidade de enriquecer o projeto com informações importantes dos pacientes participantes da pesquisa como sexo, idade, raça, grupo sanguíneo e uso de DDAVP, visando aumentar o conhecimento sobre o contexto local da DvW. A demanda foi levada ao Serviço de Pesquisa da Fundação Hemominas, que entendeu que as informações adicionais poderiam trazer um ganho científico para a Fundação e contribuiriam com uma causa relevante para a sociedade. Dessa forma, foi apresentada pelos autores do presente estudo uma emenda ao projeto original relativa à inclusão das informações adicionais sobre os pacientes, a qual foi posteriormente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Para minimizar os riscos de quebra de confidencialidade, os dados dos pacientes participantes da pesquisa foram tratados de forma anonimizada. Para isso, os resultados foram associados apenas ao número do pedido/amostra.

Diante do exposto, foi solicitado à Fundação Hemominas o fornecimento das informações dos pacientes participantes da pesquisa (sexo, idade, cor da pele, grupo sanguíneo e uso de DDAVP) de forma anonimizada e para uso exclusivo no projeto mencionado. Uma lista contendo o número do pedido/amostra de cada paciente foi enviada ao profissional designado pela coordenação do Hemocentro para que pudesse realizar o levantamento dos dados solicitados dos pacientes.

O projeto em pauta recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas em 06/03/23 (CAAE 64775822.8.0000.5118) e a Emenda em 09/09/24 (**CAAE:** 64775822.8.0000.5118). Este estudo faz parte de um projeto maior já aprovado na Fundação Hemominas sob o número 5.926.761.

Critérios de inclusão: pacientes da Fundação Hemominas com DvW, de ambos os sexos e de qualquer idade, em uso ou não de DDAVP, ou em investigação de doença hemorrágica, evitando-se a coleta diante de sintomatologia sugestiva de doença inflamatória e/ou infecciosa. Para o grupo controle, indivíduos doadores de

sangue da Fundação Hemominas maiores de 18 anos triados previamente (amostras controles).

Critérios de não inclusão: doadores inaptos para doação de sangue, amostras com volume insuficiente, hemolisadas e/ou lipêmicas de ambos os grupos (pacientes e controles).

3.2 Métodos analíticos

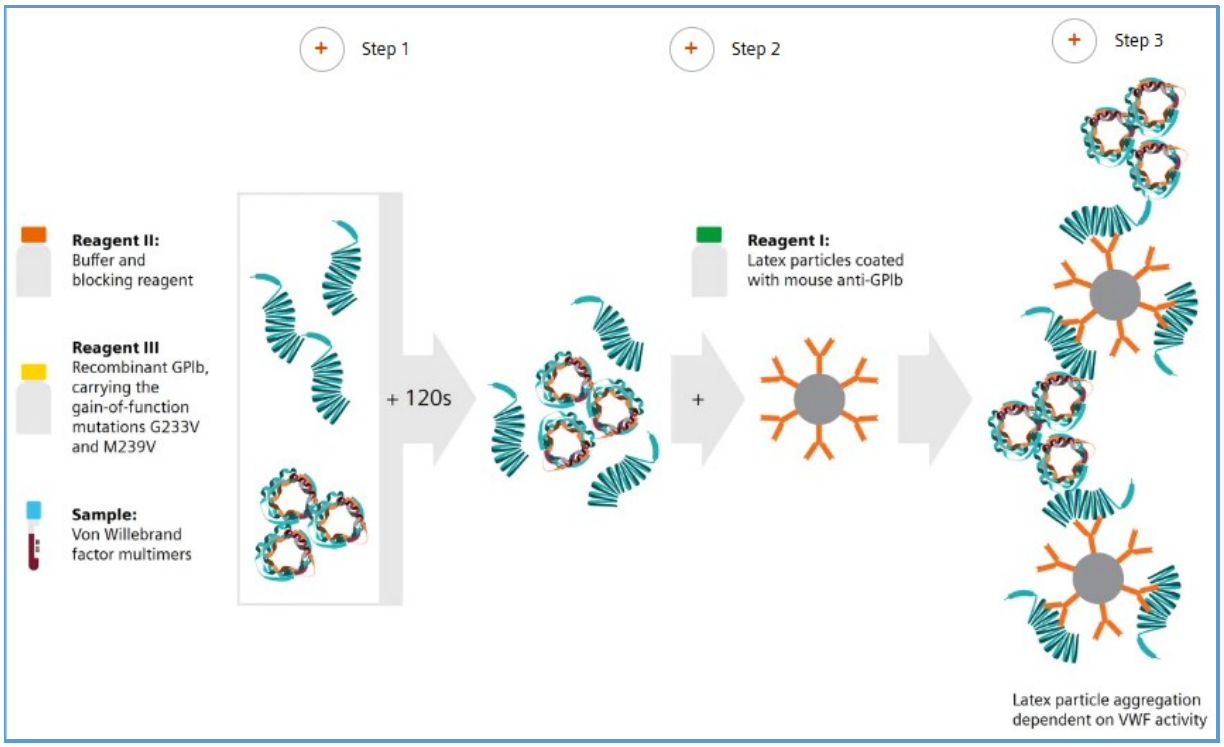
No presente estudo foi abordada metodologia comparativa entre o método diagnóstico automatizado kit INNOVANCE VWF Ac da empresa Siemens (recomendação "ASH ISTH NHF WFH 2021 *Guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease*") e o método semi-automatizado VWF:RCo utilizado pelo laboratório de Hematologia da Fundação Hemominas. Dosagem de VWF:Ag foi também realizada para comparação e cálculo das relações entre os dois métodos funcionais (automatizado e semi-automatizado) e o VWF:Ag. A descrição sucinta dos métodos que foram utilizados no presente estudo segue abaixo.

3.2.1 Turbidimétrico - VWF relacionado ao ganho de função GPIbM (kit INNOVANCE VWF Ac)

Segundo o fabricante (Siemens), este novo ensaio utiliza a ligação do VWF ao seu receptor Glicoproteína Ib (GPIb), o qual é o principal receptor do VWF nas plaquetas. Partículas de látex são revestidas com um anticorpo contra GPIb. GPIb recombinante, com dois ganhos de função, é adicionado e se liga ao anticorpo, bem como ao VWF da amostra. Isso significa que no Ensaio INNOVANCE VWF Ac, devido às mutações de ganho de função, a ligação do VWF ao GPIb não requer ristocetina. Dessa forma, a ristocetina usualmente utilizada para ativação do domínio A1 do VWF no tradicional teste agregométrico (VWF:RCo), não é mais necessária.

A adição de plasma do paciente induz uma aglutinação dependente de VWF, que é detectada turbidimetricamente, utilizando o aparelho marca Sysmex, modelo CS 2500 (Figura 5). Os resultados são expressos em porcentagem (%) de um *pool* normal de plasmas, onde 100% do normal corresponde a 100UI/dL de VWF:Ag. Valor de referência: 48 a 173%.

Figura 5. Ensaio Turbidimétrico Kit INNOVANCE VWF Ac Siemens



Fonte: Folder apresentação do kit INNOVANCE VWF Ac Siemens

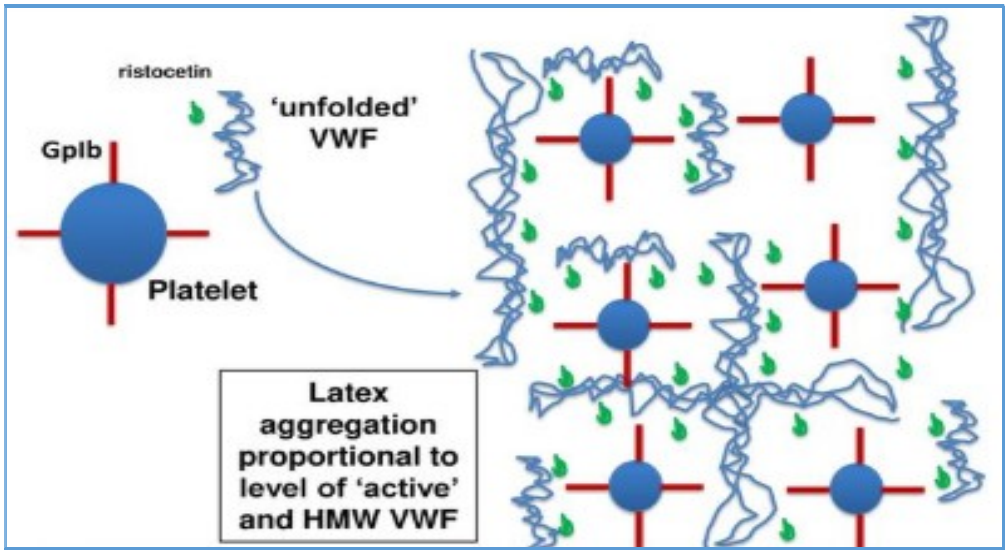
3.2.2 Agregométrico - Cofator de Ristocetina (VWF:RCo)

A determinação do VWF:RCo por agregometria (leitura óptica) mede a atividade funcional do VWF. Este ensaio utiliza ristocetina, um antibiótico, para induzir uma mudança conformacional na molécula do VWF, expondo melhor o domínio A1 da molécula que está presente no plasma de pacientes e que agrega as plaquetas exógenas normais (lavadas e formalizadas), mediante a união a seu receptor - glicoproteína GP1b (Figura 6).

A determinação do VWF:RCo requer o emprego de plasma normal padronizado diluído em diferentes concentrações para produzir a curva padrão, além de quantidade padronizada de ristocetina e plaquetas. A quantidade de ristocetina deve ser elevada em relação ao VWF para propiciar alta estimulação. A curva padrão, feita com plasma de referência, relaciona a diluição com a amplitude de agregação, permitindo a comparação com os resultados do paciente para quantificar a atividade do VWF, ou seja, o VWF:RCo.

As principais limitações do VWF:RCo incluem o tempo, a complexidade de execução, a sensibilidade baixa e a maior imprecisão. O coeficiente de variação do teste pode variar de 10% a 40%. Para a realização deste teste é utilizado o aparelho marca Chrono-log, modelo 700. Os resultados são expressos em porcentagem (%) de um *pool* normal de plasmas, onde 100% do normal corresponde a 100 UI/dL de VWF:RCo. Valor de referência: 50 a 200%.

Figura 6. Ensaio agregométrico VWF:RCo

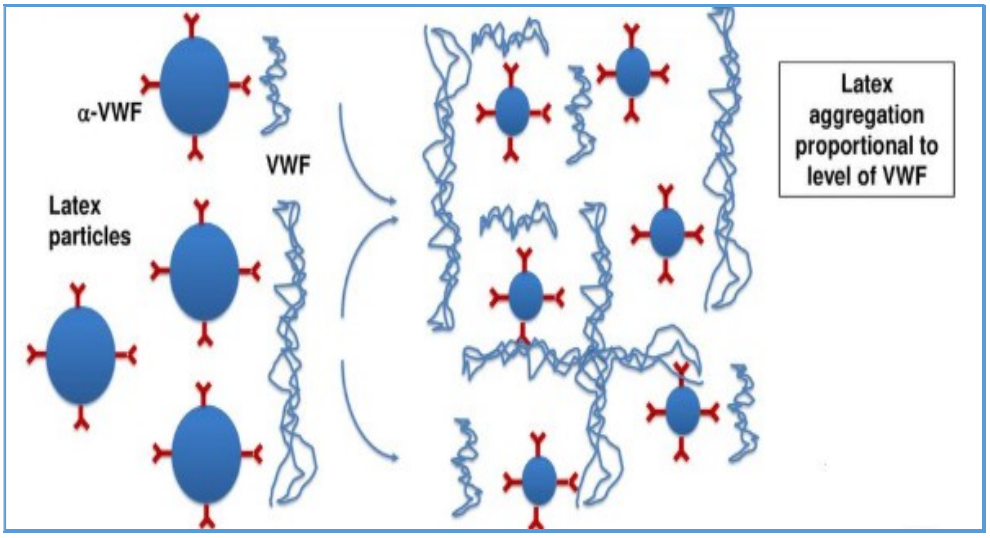


Fonte: Extraído da apresentação de Favaloro, NSW Health Pathology, 2017.

3.2.3 Turbidimétrico - Fator de von Willebrand Antígeno (VWF:Ag)

Segundo o fabricante (Siemens), misturando as amostras que contêm o antígeno de von Willebrand com o reagente, as pequenas partículas de poliestireno dotadas de anticorpos, aglomeram-se. Os anticorpos específicos combinam-se com as partículas através de ligações covalentes. Seguidamente, esta aglutinação é determinada turbidimetricamente pelo aumento da turbidez, utilizando o aparelho marca Sysmex, modelo CS 2500. A turbidez é diretamente proporcional ao nível de antígeno da amostra (Figura 7). Os resultados são expressos em porcentagem (%) de um *pool* normal de plasmas, onde 100% do normal corresponde a 100 UI/dL de VWF:Ag. Valor de Referência: 50 a 160%.

Figura 7. Ensaio turbidimétrico VWF:Ag



Fonte: Extraído da apresentação de Favaloro, NSW Health Pathology, 2017.

3.2.4 Coagulométrico – Fator VIII:C (Atividade Coagulante do Fator VIII)

A dosagem do Fator VIII:C é realizada por método coagulométrico de uma etapa, segundo as instruções do fabricante (Siemens), utilizando-se o analisador automático de coagulação Sysmex, modelo CS-2500. Neste ensaio funcional, a amostra do paciente é diluída e incubada com um plasma humano com deficiência conhecida de Fator VIII. A ativação da cascata intrínseca da coagulação é feita por meio de reagente ativador de TTPA, (Actin FSL), e a adição de cálcio. A formação do coágulo é monitorada pelo equipamento por meio da alteração óptica na amostra. O tempo de coagulação é inversamente proporcional à concentração de Fator VIII funcional na amostra. A quantificação é feita com base em uma curva padrão obtida a partir de diluições conhecidas de um plasma calibrador. Os resultados são expressos em porcentagem (%) de um pool normal de plasmas, onde 100% corresponde a 100 UI/dL de Fator VIII:C. Valor de referência: 50 a 150%.

3.2.5 Análise estatística

O teste de Shapiro Wilk foi utilizado para testar a normalidade dos dados. As variáveis quantitativas, quando não apresentavam distribuição normal foram descritas como mediana (1º e 3º quartis) e valores mínimos e máximos. Para visualizar as informações dos quartis foi utilizado o gráfico Box-plot, que permite ver os valores *outliers*, a mediana e quartis, a variabilidade e a forma da distribuição. As variáveis categóricas foram descritas pelas frequências absolutas e porcentagens. O

teste de Wilcoxon para amostras pareadas foi utilizado para avaliar a diferença entre métodos. Para análise de correlação, utilizou-se a correlação de Spearman, já que as variáveis não apresentaram distribuição normal, enquanto para análise da concordância das variáveis quantitativas utilizou-se o Índice de correlação Intraclasse para concordância (ICC). Esse índice é uma ferramenta estatística que mede a concordância entre múltiplas medições feitas por diferentes avaliadores ou instrumentos ou métodos. Ele é usado para avaliar a confiabilidade ou consistência dessas medições. Os gráficos de dispersões foram utilizados para visualização das correlações entre os métodos. Nas análises comparativas, o teste não-paramétrico de Mann Whitney foi utilizado na comparação de dois grupos, enquanto para a comparação de três ou mais grupos, foi utilizado o teste de Kruskal Wallis, pois os dados não apresentaram distribuição normal. O software utilizado foi o SPSS versão 20.0 e o nível de significância foi de 0,05.

4 RESULTADOS

Caracterização dos Pacientes

No presente estudo foram incluídos 115 indivíduos (95 pacientes + 20 controles) com mediana de idade de 27 anos (Q1=14; Q3=38). A distribuição etária revelou que 34,8% dos participantes tinham até 18 anos, 44,3% estavam entre 19 e 40 anos e 20,9% tinham mais de 40 anos. A amostra foi composta predominantemente por mulheres (69,6%), da raça parda (50,4%), seguida pela raça branca (40,0%) e preta (9,6%). Em relação ao grupo sanguíneo, 52,2% dos participantes pertenciam ao tipo O. Dos 115 indivíduos analisados, que resultaram em 124 amostras, 6 pacientes foram submetidos ao teste com DDAVP. Destes 6 pacientes, 3 realizaram testes em dois momentos, antes e 1 hora após o uso do DDAVP, enquanto os outros 3 realizaram testes completos (em três momentos), antes, 1 hora após e 4 horas após o uso do DDAVP. Essa abordagem justifica o aumento no número total de amostras coletadas, ou seja, de 115 para 124. Os dados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Caracterização dos pacientes, controle e pacientes+controle admitidos na Fundação Hemominas

Variáveis	Paciente n=95	Controle n=20	Paciente+Controle n=115
Idade (anos)			
Mediana (Q1; Q3)*	27,00 (13,00 ; 37,00)	31,50 (22,75 ; 42,00)	27,00 (14,00 ; 38,00)
Faixa etária n (%)			
<=18 anos	40 (42,1)	0 (0,0)	40 (34,8)
19 a 40 anos	36 (37,9)	15 (75,0)	51 (44,3)
>40 anos	19 (20,0)	5 (25,0)	24 (20,9)
Sexo n (%)			
Feminino	70 (73,7)	10 (50,0)	80 (69,6)
Masculino	25 (26,3)	10 (50,0)	35 (30,4)
Cor da pele n (%)			
Branca	39 (41,1)	7 (35,0)	46 (40,0)
Parda	48 (50,5)	10 (50,0)	58 (50,4)
Preta	8 (8,4)	3 (15,0)	11 (9,6)
Tipo sanguíneo n (%)			
Tipo “O”	47 (49,5)	13 (65,0)	60 (52,2)
Tipo não “O”	13 (13,7)	7 (35,0)	20 (17,4)
Sem informação	35 (36,8)	0 (0,0)	35 (30,4)
Está em uso de DDAVP n (%)	6 (6,3)	0 (0,0)	6 (5,2)

*Q1=1º quartil; Q3=3º quartil

Desempenho dos Métodos Analíticos

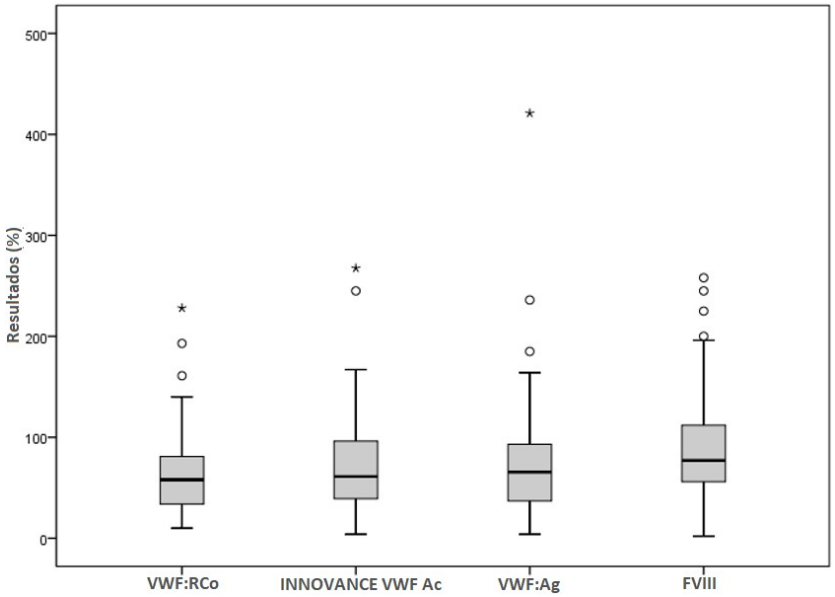
A Tabela 3 apresentam os **v**alores medianos e o intervalo interquartis (Q1-Q3) das variáveis VWF:RCo, INNOVANCE VWF Ac, VWF:Ag e FVIII nos grupos Pacientes (n=104), Controles (n=20) e Pacientes+Controles (n=124). A Figura 8 apresenta um gráfico *Boxplot* que resume visualmente a distribuição do conjunto de dados para os testes VWF:RCo, INNOVANCE VWF Ac, VWF:Ag e FVIII. A tabela 4 apresenta valores medianos (Q1-Q3) para as relações entre os métodos de atividade (INNOVANCE VWF Ac e VWF:RCo) e o método de VWF:Ag e para a relação FVIII/VWF:Ag. A comparação entre os valores de VWF:RCo e INNOVANCE VWF Ac foi realizada por meio do teste de Wilcoxon para amostras pareadas**,** que demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os métodos **(**$p < 0,0001$**).**

Tabela 3. Valores medianos e quartis (Q1-Q3) obtidos para os testes VWF:RCo, INNOVANCE VWF Ac, VWF:Ag e FVIII.

Variáveis	Amostras Paciente n=104	Amostras Controle n=20	Paciente+Controle n=124
VWF:RCo	59,00 (34,75 – 85,50)	96,00 (77,00 – 102,50)	64,00 (40,25 - 94,00)
INNOVANCE VWF Ac	62,05 (39,30 – 96,38)	110,95 (95,00 – 119,25)	71,15 (43,85 - 105,15)
VWF:Ag	66,50 (38,50 – 95,00)	118,50 (95,50 – 128,00)	74,00 (46,75 – 108,00)
FVIII	76,60 (56,00 – 111,30)	---------	77,00 (55,25 - 112,00)

Nota: Resultados em %. Não foram realizados testes de FVIII para as amostras controles. Amostras de pacientes para FVIII n=102

Figura 8. Comparação dos resultados dos testes VWF:RCo, INNOVANCE VWF Ac, VWF:Ag e FVIII



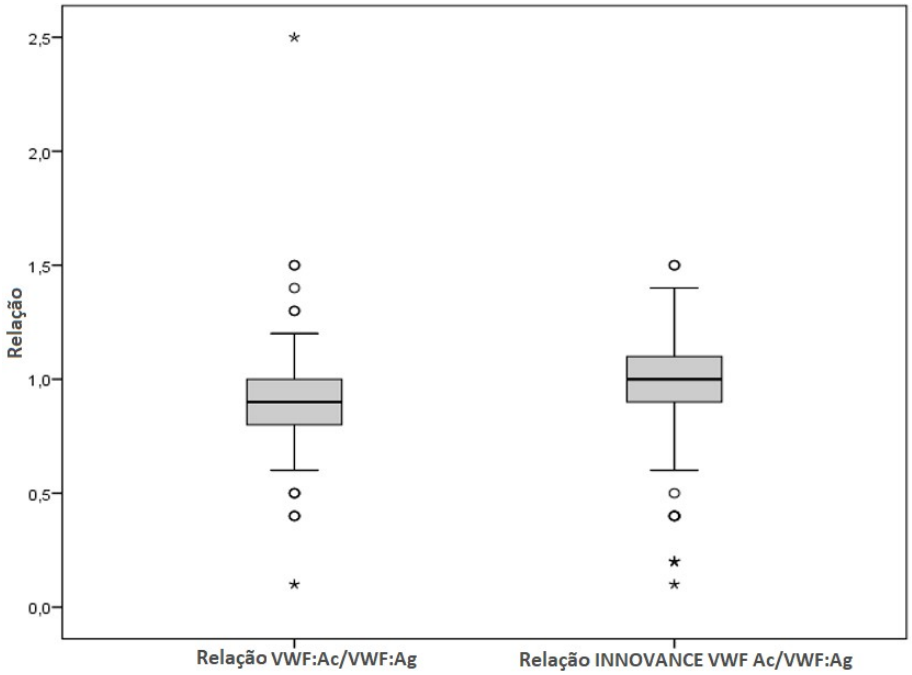
Nota: Cada *boxplot* exibe a mediana (linha horizontal), o intervalo interquartil (1º quartil e 3º quartil) e os valores mínimo e máximo dentro do limite esperado (barras verticais). Os círculos abertos representam *outliers* moderados e os asteriscos representam *outliers* extremos.

Tabela 4. Valores medianos (Q1-Q3) para as relações entre os métodos de atividade (INNOVANCE VWF Ac e VWF:RCo) e o método de VWF:Ag

Variáveis	Mediana (Q1-Q3)
	Relação
Relação VWF:RCo/VWF:Ag	0,90 (0,80; 1,00)
Relação INNOVANCE VWF Ac/VWF:Ag	1,00 (0,90; 1,10)

Nota: tamanhos de amostras: VWF:RCo (n=124), INNOVANCE VWF Ac (n=124), VWF:Ag (n=124), Q1=1º quartil; Q3=3º quartil

Figura 9. Comparação dos resultados das relações VWF:RCo/VWF:Ag e INNOVANCE VWF Ac/VWF:Ag

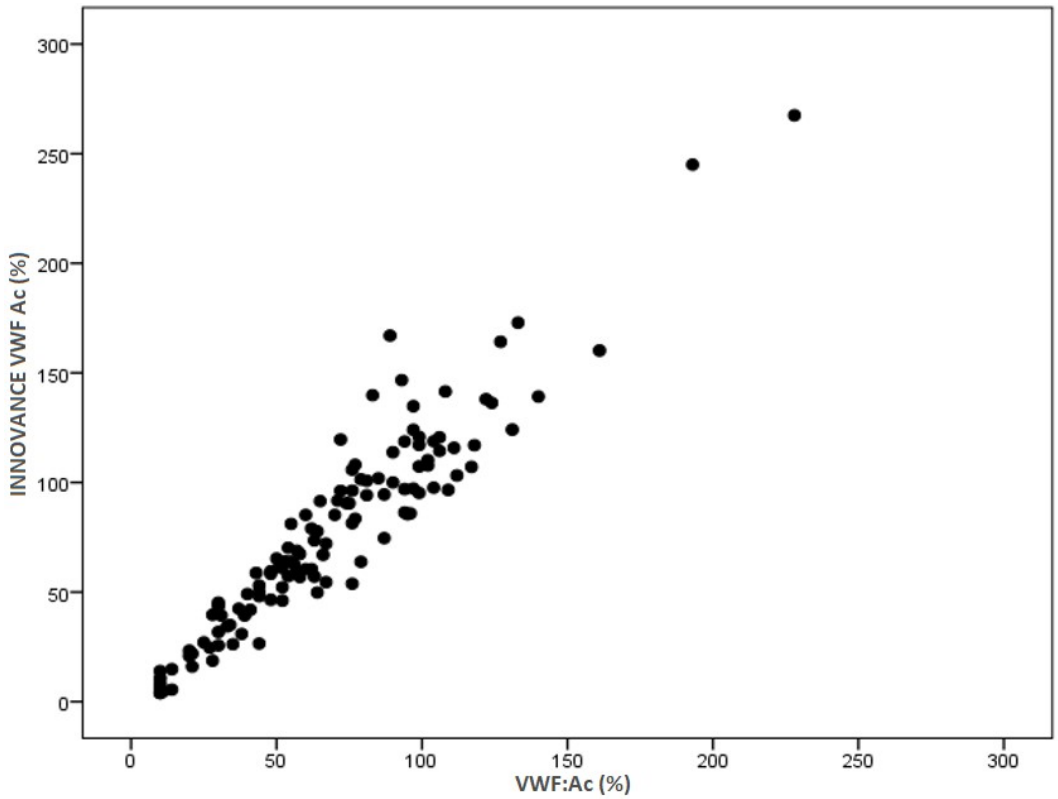


Nota: Cada *boxplot* exibe a mediana (linha horizontal), o intervalo interquartil (1º quartil e 3º quartil) e os valores mínimo e máximo dentro do limite esperado (barras verticais). Os círculos abertos representam *outliers* moderados e os asteriscos representam *outliers* extremos.

Correlação e Concordância entre Métodos

A correlação de Spearman revelou uma forte correlação entre as técnicas INNOVANCE VWF Ac e VWF:RCo ($r=0,944$; $p<0,05$). O índice de correlação intraclasse (ICC) também indicou excelente concordância (ICC=0,953; IC95%: 0,900-0,974), reforçando a equivalência analítica das técnicas.

Figura 10. Relação entre os ensaios VWF:RCo e INNOVANCE VWF Ac: análise por gráfico de dispersão



Nota: gráfico de dispersão apresenta a correlação entre os resultados do ensaio VWF:RCo e do ensaio INNOVANCE VWF Ac. As concentrações são expressas em percentual (%) nos eixos X e Y.

Teste de Reprodutibilidade

Ensaio INNOVANCE VWF Ac

Os resultados de reprodutibilidade foram avaliados com base nas repetições realizadas de dois controles comerciais liofilizados contidos no ensaio INNOVANCE VWF Ac e nos valores históricos dos controles de *pools* de amostras para o VWF:RCo da Fundação Hemominas.

Estudos de imprecisão foram realizados para a curva de calibração de médio intervalo utilizando controles comerciais liofilizados - Controle Normal (CN) Lote 507919 e Controle Patológico (CP) Lote 556737. Ambos controles comerciais se mostraram dentro dos limites aceitáveis (Tabela 5).

Tabela 5. Teste de Imprecisão do ensaio INNOVANCE VWF Ac durante o período de 3 dias.

Resultados Observados (n=34)	Média (%)	SD	CV%
CN	102,95	2,00	1,94
CP	27,7	1,29	4,67

Nota: Dados do fabricante: CN [80,0 a 120,0], CP [25,0 a 37,0]. Limites aceitáveis de CV% para INNOVANCE VWF Ac= 7%. SD = desvio padrão; CV% = coeficiente de variação em %.

Ensaio VWF:RCo

Os valores históricos de controles apresentaram CV% de 9,54% para Controle de *pool* de *Plasma* Normal (PPN) e 12,66% para Controle de *pool* de Plasma Patológico (PPP), significativamente mais altos que os observados para o ensaio INNOVANCE VWF Ac (Tabela 6).

Tabela 6. Histórico de imprecisão do ensaio VWF:RCo

Resultados Observados (n=60)	Média (%)	SD	CV%
PPN	98,22	9,43	9,54
PPP	39,18	4,96	12,66

Nota: Dados do laboratório: PPN [70,0 a 130,0], PPP [26,0 a 52,0]. Limites aceitáveis de CV% para VWF:RCo = 20%.

Impacto de variáveis biológicas nos resultados

Os resultados da dosagem de VWF obtidos pelas duas técnicas foram avaliados em função do grupo sanguíneo ABO, da idade e uso de DDAVP, os quais estão descritos abaixo.

Grupo Sanguíneo:

Indivíduos do grupo "O" apresentaram valores consistentemente mais baixos em comparação aos do grupo não "O" mostrando que a diferença de tendências central tem significância clínica, apesar de não ocorrer significância estatística, portanto, sugerem uma tendência à significância, corroborando estudos anteriores (Tabela 7).

Tabela 7. Resultados das comparações, expressos como mediana, entre os métodos VWF:RCo, INNOVANCE VWF Ac e VWF:Ag considerando os grupos sanguíneos “O” e não “O”.

Variáveis	Grupo sanguíneo		
	Tipo “O” n=66	Tipo não “O” n=22	Valor-p*
VWF:RCo	57,50 (37,75 ; 89,25)	85,00 (56,75 ; 99,00)	0,095
INNOVANCE VWF Ac	63,25 (39,53 ; 101,40)	92,90 (55,85 ; 111,10)	0,097
VWF:Ag	60,50 (33,75 ; 101,25)	95,00 (60,25 ; 122,50)	0,184

* Teste de Mann Whitney. Resultados em %.

Idade

Com relação à idade, não foi observada diferença significativa entre as três faixas etárias analisadas, embora tenha sido observada uma tendência ao aumento tanto do VWF:RCo, INNOVANCE VWF Ac, VWF:Ag quanto para o FVIII à medida do aumento da idade (Tabela 8). Entretanto, vale ressaltar que somente o INNOVANCE VWF Ac teve uma tendência significativa ao nível de 0,07 (Tabela 8).

Tabela 8. Resultados das comparações expressos como mediana entre os métodos VWF:RCo, INNOVANCE VWF Ac, VWF:Ag e FVIII por faixa etária.

Variáveis	Faixa etária			Valor-p*
	<=18 anos n=44	19 a 40 anos n=54	>40 anos n=26	
VWF:RCo	55,50	66,50	95,00	0,111
INNOVANCE VWF	58,90	74,10	96,80	0,069
VWF:Ag	60,50	76,50	92,50	0,147
FVIII**	80,00	70,00	105,00	0,222

* Teste Kruskal wallis. Resultados em %. **o tamanho da amostra do FVII foi 43 para <18 anos, 39 para 19 a 40 anos e 20 para >40 anos.

Resposta ao DDAVP

No presente estudo, estão apresentados os resultados de apenas três pacientes, os quais realizaram todas as etapas do exame: antes da administração de DDAVP, 1 hora após a administração e 4 horas após (Figuras 11, 12 e 13). O paciente 1 apresentou níveis de VWF:RCo e INNOVANCE VWF Ac sem variações significativas ao longo do tempo e VWF:Ag estável. O Paciente 2 demonstrou uma resposta robusta ao DDAVP, com elevações consideráveis em todos os parâmetros

analisados na 1ª hora, seguidas por redução parcial em 4 horas, mantendo níveis acima dos basais. O Paciente 3 apresentou elevação acentuada em todos os marcadores na 1ª hora, com menor queda em 4 horas, indicando uma resposta mais sustentada.

Figura 11. Resultados paciente 1.

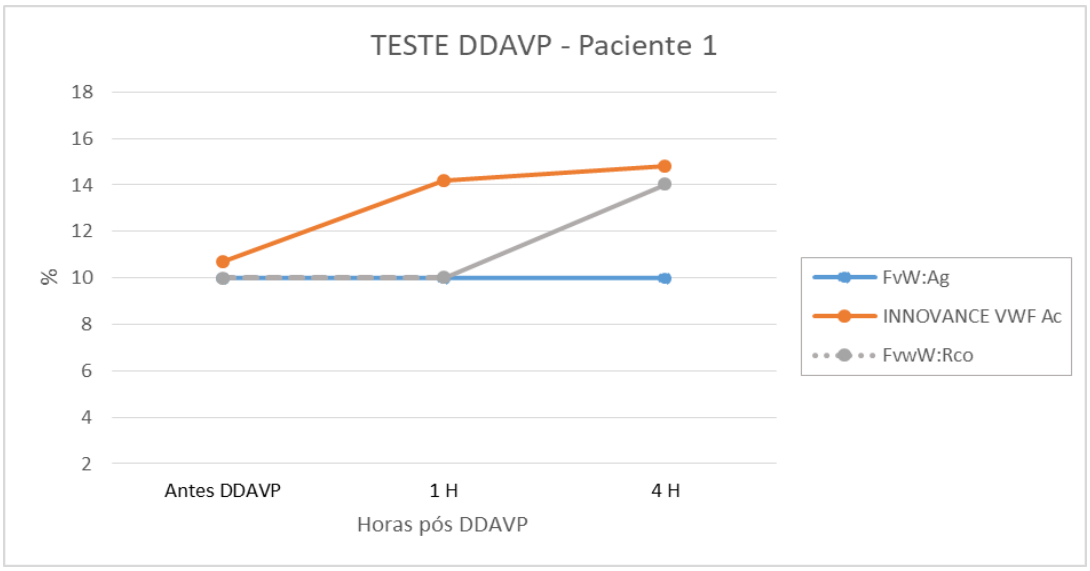


Figura 12. Resultados paciente 2.

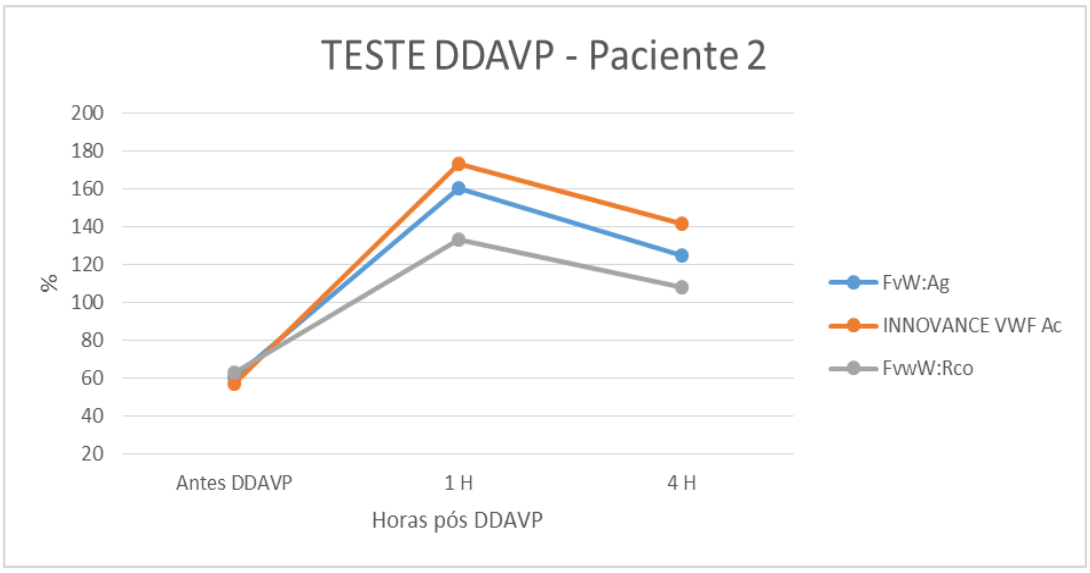
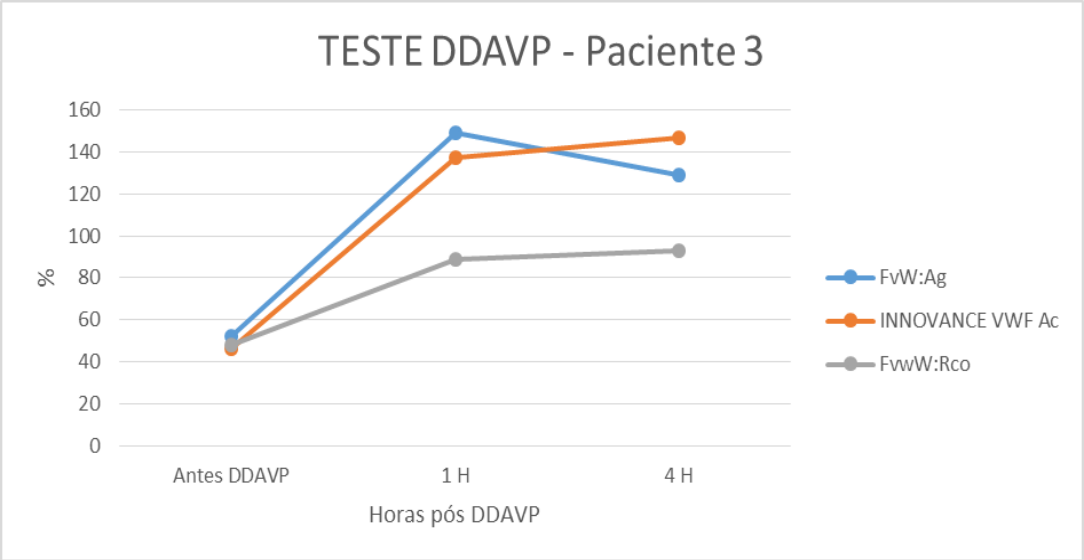


Figura 13. Resultados paciente 3.



Pontos de corte Relação Atividade/VWF:Ag

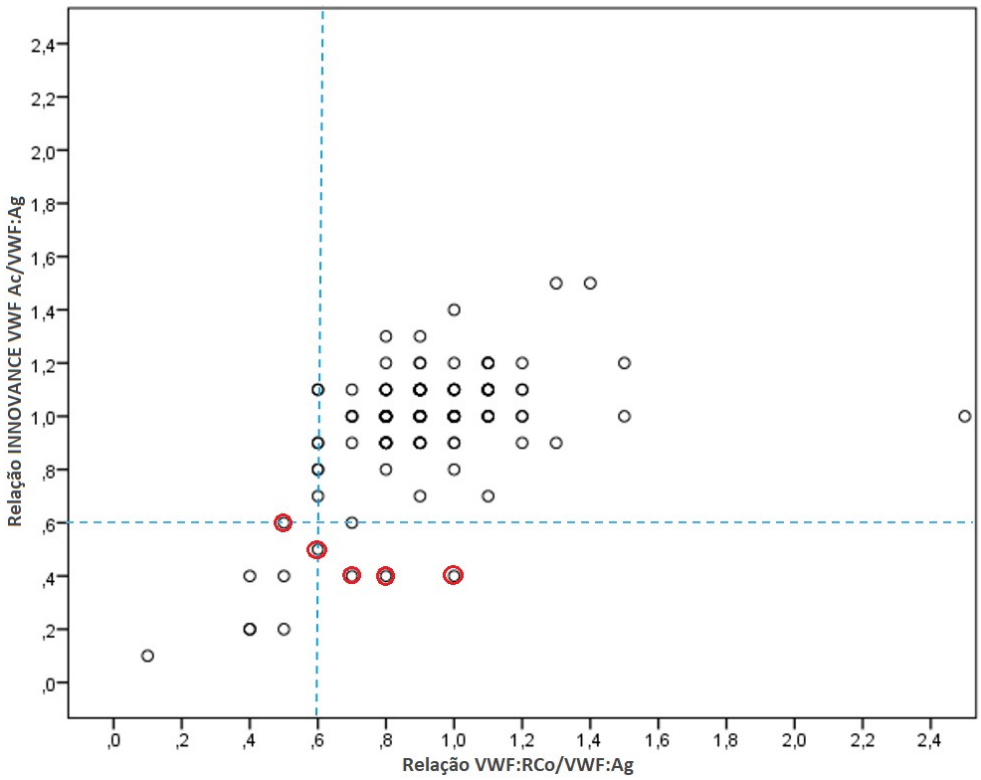
Quando analisados diferentes pontos de corte para as relações INNOVANCE VWF Ac/ VWF:Ag e VWF:RCo/VWF:Ag, observou-se que o ponto de corte igual a 0,6 para ambas ou 0,6 para VWF:RCo/ VWF:Ag e 0,7 para INNOVANCE VWF Ac/VWF:Ag parecem ser os mais adequados, pois eles foram capazes de captar um menor número de indivíduos discordantes (5 indivíduos) em relação ao ponto de corte de 0,7 para ambos com 11 indivíduos discordantes. Esses dados são mostrados na Tabela 9 e ilustrados nas Figuras 14, 15 e 16. No entanto, há uma particularidade a ser considerada e que influenciou no número de discordância que é o fato do limite inferior de quantificação da técnica VWF:RCo ser 10%. No caso, para 4 indivíduos discordantes foram liberados resultados como 10% para VWF:RCo. Para que essa limitação não interferisse, seria necessário considerar os cálculos da relação somente quando os resultados de VWF:Ag fossem maiores que 19%. Para pacientes com VWF:RCo <10% e VWF:Ag <19 %, esses pacientes seriam classificados como tendo 'dificuldades de classificação' porque não seria possível determinar se o VWF:RCo/VWF:Ag estava acima ou abaixo de 0,6. Se VWF:RCo for 10% e VWF:Ag for ≤19%, a razão VWF:RCo/VWF:Ag pode ser tanto ≤0,6 quanto >0,6, dependendo do valor real de VWF:RCo (que pode ser menor que 10%, mas não é reportado devido à limitação da técnica). Para minimizar essa incerteza,

definiu-se que apenas valores de VWF:Ag superiores a 19% poderiam ser utilizados com segurança nos cálculos, garantindo que a razão fosse determinada de maneira confiável. Exemplo: Se VWF:Ag = 20%, então 10%/20% = 0,5, está abaixo do ponto de corte de 0,6, permitindo a classificação. Qualquer um valor fictício menor que 10% levaria a um resultado de ponto de corte menor que 0,6.

Tabela 9. Pontos de corte para as relações VWF:RCo/VWF:Ag e INNOVANCE VWF Ac/ VWF:Ag

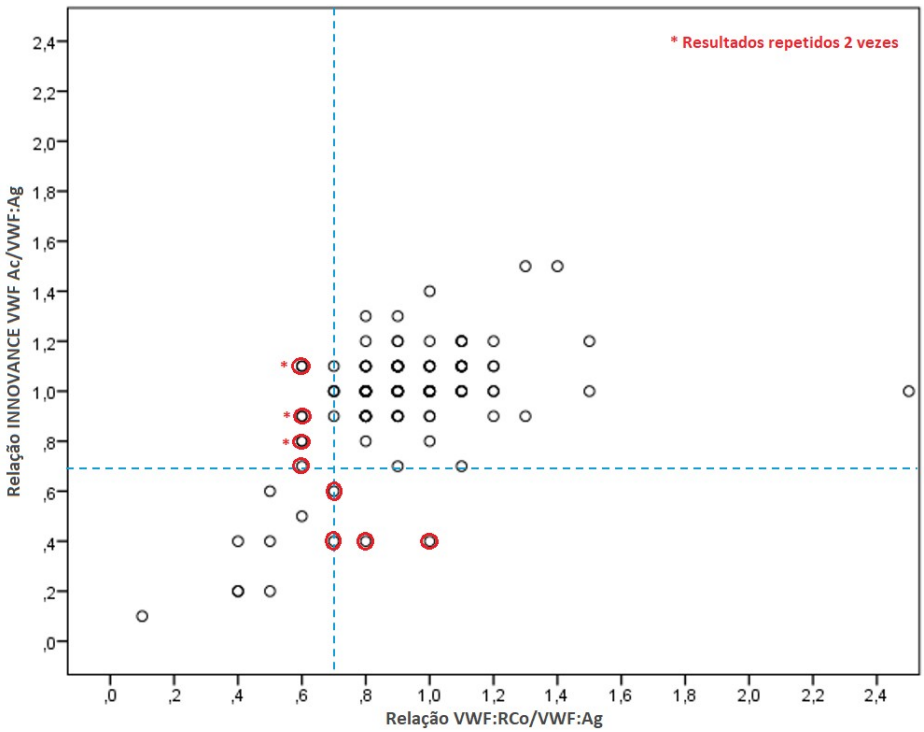
Pontos de cortes (n=124)	Concordantes n (%)	Discordantes n (%)
0,6 para ambas	119 (96,0)	5 (4,0)
0,6 para VWF:RCo/VWF:Ag e 0,7 para INNOVANCE VWF Ac/ VWF:Ag	119 (96,0)	5 (4,0)
0,7 para ambos	113 (91,2)	11 (8,8)

Figura 14. Relação VWF:RCo/VWF:Ag 0,6 X Relação INNOVANCE VWF Ac/VWF:Ag 0,6



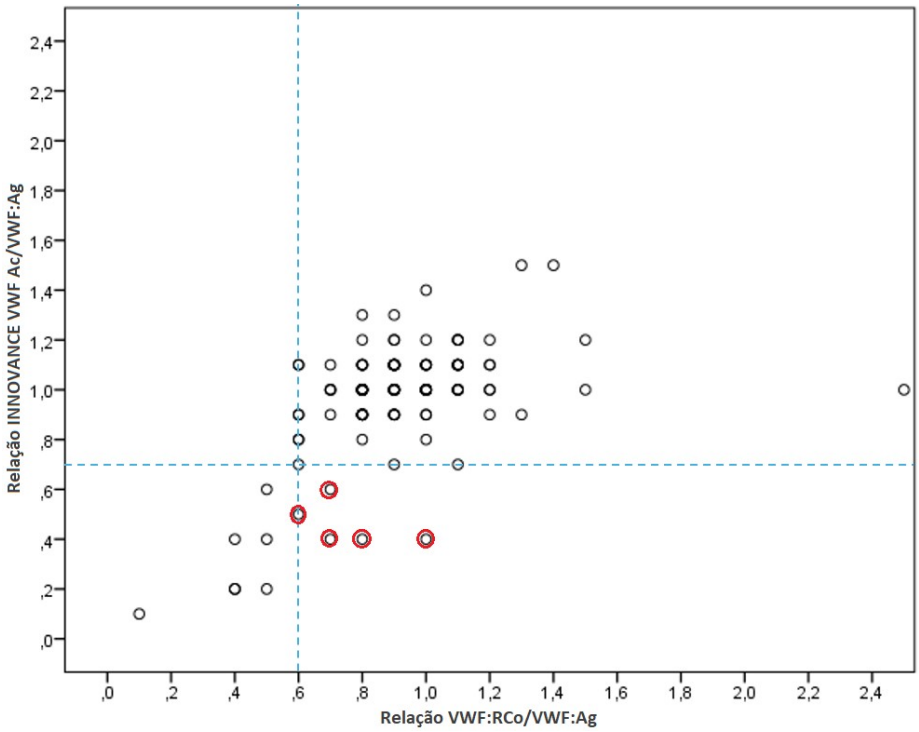
Nota: A figura apresenta a relação entre as variáveis VWF:RCo/VWF:Ag e INNOVANCE VWF Ac/VWF:Ag, ambos padronizados para o ponto de corte de 0,6. O gráfico permite a avaliação da correlação entre os dois métodos de ensaio e suas respectivas distribuições.

Figura 15. Relação VWF:RCo/VWF:Ag 0,7 X Relação INNOVANCE VWF Ac/VWF:Ag 0,7



Nota: A figura apresenta a relação entre as variáveis VWF:RCo/VWF:Ag e INNOVANCE VWF Ac/VWF:Ag, ambos padronizados para o ponto de corte de 0,7. O gráfico permite a avaliação da correlação entre os dois métodos de ensaio e suas respectivas distribuições

Figura 16. Relação VWF:RCo/VWF:Ag 0,6 X Relação INNOVANCE VWF Ac/VWF:Ag 0,7



Nota: A figura apresenta a relação entre as variáveis VWF:RCo/VWF:Ag, padronizada para o ponto de corte 0,6 e INNOVANCE VWF Ac/VWF:Ag, padronizada para o ponto de corte 0,7. O gráfico permite a avaliação da correlação entre os dois métodos de ensaio e suas respectivas distribuições.

5 DISCUSSÃO

A comparação entre os métodos de dosagem da atividade do VWF evidencia as vantagens do sistema automatizado INNOVANCE VWF Ac em relação ao teste convencional VWF:RCo. Entre esses benefícios, destacam-se a maior precisão, a redução de erros analíticos associados a processos manuais e a maior reprodutibilidade dos resultados. Além disso, é importante ressaltar que o método convencional (VWF:RCo) depende de reagentes biológicos instáveis, como plaquetas humanas, o que o torna suscetível à variabilidade e problemas de estabilidade. Nesse contexto, a adoção de um sistema moderno e automatizado se mostra uma alternativa altamente desejável, promovendo maior padronização e atendendo à crescente demanda por consistência nos diagnósticos. Adicionalmente, a sensibilidade aprimorada do INNOVANCE VWF Ac possibilita a detecção de anomalias funcionais, especialmente em pacientes com níveis baixos ou borderline de VWF, algo que o teste VWF:RCo frequentemente não consegue alcançar.

Em termos de desempenho analítico, os dados mostraram que o INNOVANCE VWF Ac apresentou uma mediana de atividade funcional mais elevada (71,15%) em comparação ao método tradicional VWF:RCo (64,00%). A análise estatística confirmou essa diferença como significativa ($p < 0,0001$), sugerindo maior sensibilidade analítica do método automatizado na detecção da atividade funcional do VWF. Além disso, a razão entre atividade funcional e VWF:Ag foi próxima de 1 (1,00; Q1=0,90; Q3=1,10) para o INNOVANCE VWF Ac, indicando melhor alinhamento com a concentração real da proteína. Os achados deste estudo indicam uma redução significativa nos valores de VWF:RCo, INNOVANCE VWF Ac e VWF:Ag no grupo de pacientes em comparação ao grupo controle o que já era esperado pelo fato de os exames avaliados fazerem parte do protocolo de triagem laboratorial dentro de perfis das doenças hemorrágicas. É importante destacar que o limite inferior de quantificação do INNOVANCE VWF Ac usado nos testes é de 4,0% e o do VWF:RCo é bem mais alto (10%), o que dificulta a utilização deste último teste para identificar e diferenciar entre tipos de DvW com baixas atividades. Essa acurácia aprimorada é crucial para detectar variações sutis que podem impactar a classificação da DvW e a conduta terapêutica.

O estudo avaliou a performance do ensaio INNOVANCE VWF Ac, que utiliza a ligação do VWF à GPIb recombinante, comparando-o com os métodos VWF:RCo. A hipótese de que o primeiro método apresenta um desempenho comparável ao segundo foi apoiada pelos resultados, que demonstraram uma forte correlação entre os métodos INNOVANCE VWF Ac e VWF:RCo, com um coeficiente de Spearman de 0,944 ($p<0,05$). Além disso, o índice de correlação intraclasse (ICC) de 0,953 (IC95%: 0,900-0,974) indica uma elevada concordância analítica (BODÓ *et al*., 2015; BOENDER *et al*., 2018; WEYAND e FLOOD, 2021).

Os resultados de reprodutibilidade apresentados nas Tabelas 5 e 6 evidenciaram a robustez técnica do INNOVANCE VWF Ac. Estudos de imprecisão realizados com controles comerciais revelaram coeficientes de variação (CV%) de 1,94% para o controle normal e 4,67% para o controle patológico, mantendo-se dentro dos limites estipulados (CV% <7,00), o que demonstrou a confiabilidade do método. Essa redução na variabilidade analítica confere maior segurança aos resultados obtidos com o INNOVANCE VWF Ac, o que é particularmente relevante em cenários clínicos que exigem precisão elevada, como no diagnóstico de subtipos raros da DvW. Embora se trate de matrizes diferentes de controles, o levantamento do histórico de CV% com controles de *pool* de amostras biológicas do VWF:RCo apresentou CV% de 9,54% para nível normal e 12,66% para nível patológico. Além do mais, os valores de tais CVs% se mostraram significativamente mais altos como era esperado para a metodologia VWF:RCo (BODÓ *et al*., 2015; BOENDER *et al*., 2018; WEYAND e FLOOD, 2021).

O método INNOVANCE VWF Ac trouxe um significativo ganho de produtividade devido à sua capacidade de automação e integração com plataformas de interfaceamento e gestão laboratorial, possibilitando o processamento simultâneo de um maior volume de análises de forma eficiente. A eliminação de etapas dependentes do uso de reagentes biológicos, como plaquetas humanas, reduziu o tempo manual de execução e minimizou a necessidade de intervenções frequentes. Uma vantagem adicional relevante é que, com o INNOVANCE VWF Ac, passou a ser necessário colher apenas um tubo de citrato de sódio, suficiente para realizar tanto a atividade quanto a dosagem do VWF:Ag, simplificando significativamente os processos de coleta, transporte e manuseio de amostras. Além disso, a automação

viabilizou a liberação automática da relação INNOVANCE VWF Ac/VWF:Ag diretamente no laudo médico via interfaceamento, atendendo a uma antiga e recorrente demanda do corpo clínico da instituição. A maior consistência analítica do método proporcionou outros benefícios relevantes, como a redução da necessidade de repetição de ensaios e a diminuição da ocorrência de resultados inconclusivos, otimizando tempo e recursos, e aumentando a confiabilidade dos resultados laboratoriais. Isso posto, a avaliação do método INNOVANCE VWF Ac indicou ser o mesmo especialmente adequado para o processamento em larga escala, sendo ideal para laboratórios de alta demanda, como é o caso da Fundação Hemominas e outros Hemocentros. No que diz respeito aos custos operacionais, o uso de reagentes sintéticos e estáveis reduz desperdícios e prolonga a durabilidade dos insumos, minimizando riscos de degradação ou contaminação. Por fim, o método automatizado simplifica o treinamento técnico exigido, reduzindo a dependência de habilidades específicas para a execução dos testes e permitindo uma redistribuição mais eficiente das tarefas entre os profissionais, o que contribuiu de forma significativa para otimizar o uso de recursos humanos e melhorar a eficiência geral do laboratório.

Quanto à possível interferência dos grupos sanguíneos “O” versus “não O” nos valores de VWF, os resultados do estudo mantêm-se alinhados com a hipótese de que indivíduos com grupo sanguíneo "O" apresentam níveis mais baixos de VWF e de atividade do VWF, em comparação aos indivíduos de grupos sanguíneos não "O". Conforme a tabela 7, para os métodos VWF:RCo, INNOVANCE VWF Ac e VWF:Ag, observou-se uma tendência consistente de níveis reduzidos, aproximadamente, 30% menor de VWF no grupo "O", principalmente, para VWF:RCo e INNOVANCE VWF Ac (MILLER *et al*., 2003; FRANCHINI *et al*., 2007; WARD *et al.*, 2020). Embora as diferenças entre os grupos não tenham alcançado significância estatística no nível de 0,05, os dados sugerem uma tendência biologicamente relevante e a ausência de significância estatística pode ser atribuída à limitação no tamanho da amostra (n=88) e à variabilidade individual dos níveis de VWF. Ainda assim, a consistência dos resultados reforça a importância do grupo sanguíneo como um determinante genético nos níveis de VWF. Pesquisas futuras, com amostras mais robustas e estratificação por faixas etárias ou condições clínicas específicas, poderão esclarecer melhor a magnitude e o impacto dessa associação.

A hipótese de que os níveis de VWF aumentam com a idade foi também testada no estudo, conforme apresentado na tabela 8. Os resultados mostraram que, ao comparar os valores das medições de VWF nas diferentes faixas etárias (≤18 anos, 19-40 anos e >40 anos), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os métodos utilizados (VWF:RCo, INNOVANCE VWF Ac e VWF:Ag) nas três faixas etárias, com valores de *p* superiores ao nível de significância de 0,05. Todavia, o método INNOVANCE VWF Ac, apresentou um valor de p =0,07, ou seja, uma tendência a níveis mais elevados de VWF, de acordo com o avanço da idade (MOHAMMED e FAVALORO, 2017; FOGARTY *et al*., 2020). Um aspecto importante a considerar é o tamanho amostral, especialmente na faixa etária acima de 40 anos, onde o número de participantes foi reduzido (n=26). Um número pequeno de observações pode reduzir o poder do teste, ou seja, a capacidade de detectar diferenças reais entre os grupos, mesmo que elas existam. Em um novo estudo, sugere-se que o poder do teste seja calculado durante a fase de planejamento de estudos, para garantir que o tamanho amostral seja adequado para detectar diferenças significativas. Portanto, a ausência de significância estatística robusta pode ser parcialmente atribuída ao tamanho amostral reduzido, o que pode justificar a falta de uma conclusão definitiva sobre a relação entre idade e níveis de VWF. Estudos futuros com um “n” maior, especialmente na faixa etária acima de 40 anos, seriam importantes para validar ou refutar a hipótese de um aumento progressivo nos níveis de VWF com a idade.

Os resultados obtidos no estudo revelam padrões distintos de resposta ao DDAVP entre os pacientes avaliados, evidenciando a variabilidade interindividual esperada, conforme ilustrado nas Figuras 11, 12 e 13. O Paciente 1 apresentou uma resposta bastante limitada, com valores estáveis para o VWF:RCo, VWF:Ag e ensaio INNOVANCE VWF Ac, indicando ausência de resposta significativa após a administração do DDAVP. Em contraste, o Paciente 2 apresentou uma resposta robusta ao medicamento, com elevações marcantes nos níveis de VWF pelos métodos VWF:RCo (de 63 para 133 na 1ª hora), VWF:Ag (de 60 para 160) e INNOVANCE (de 57,1 para 172,9), seguidas por uma redução parcial após 4 horas, sugerindo um padrão de resposta sustentada inicial com queda subsequente. Similarmente, o Paciente 3 apresentou elevação expressiva do VWF com todos os métodos, especialmente no ensaio INNOVANCE VWF Ac (de 46,5 para 167 na 1ª

hora), mas com menor declínio em 4 horas, evidenciando uma meia-vida funcional mais prolongada do VWF. Esses achados reforçam a utilidade do DDAVP na avaliação e tratamento da DvW, bem como a importância de considerar a variabilidade individual nas decisões terapêuticas.

Com base na hipótese de que o ponto de corte 0,7 é o mais indicado para uso na rotina laboratorial com o método INNOVANCE VWF Ac, os resultados do estudo sustentam essa escolha ao demonstrar que essa relação corresponde bem ao ponto de corte de 0,6, previamente utilizado no método VWF:RCo, que será descontinuado. A concordância observada entre 0,6 no método VWF:RCo/VWF:Ag e 0,7 no método INNOVANCE VWF Ac/VWF:Ag, com apenas 5 indivíduos discordantes (4%), reforça a adequação do ponto de corte de 0,7 para a nova metodologia. O fato de o limite inferior de quantificação da técnica VWF:RCo ser alto impactou no número de indivíduos discordantes. Como o VWF:RCo apresenta um “limite inferior de quantificação” mais alto do que o ensaio INNOVANCE VWF Ac, uma abordagem diferente para situações específicas deste ensaio foi utilizada. Pacientes apresentando atividade do VWF <10% pelo método de VWF:RCo e VWF:Ag ≥19%, teoricamente, foram classificados como DvW tipo 2 (A/B/M) porque teriam uma razão VWF:RCo/VWF:Ag < 0,6 (embora a razão precisa não possa ser calculada). Como o “limite inferior de quantificação” da atividade do VWF pelo método VWF:RCo é 10%, não é possível determinar se a relação VWF:RCo/VWF:Ag estava acima ou abaixo de 0,6 para pacientes com VWF:RCo <10% e VWF:Ag <19 %. Dessa forma, esses pacientes são classificados como tendo ‘dificuldades de classificação’. Se os resultados que tiveram essa interferência fossem desconsiderados, somente 01 resultado seria, realmente, discordante para o ponto de corte igual a 0,6 para ambas as relações; e somente 01 resultado seria discordante para o ponto de corte 0,6 para VWF:RCo/VWF:Ag e 0,7 para INNOVANCE VWF Ac/VWF:Ag. Para os pacientes com resultados discordantes, com valores limítrofes ou razões atividade-antígeno limítrofes, estudos adicionais serão úteis (incluindo ensaios de ligação de colágeno) para determinar o desempenho de cada metodologia e propor uma estratégia completa de classificação.

Adicionalmente, a adoção da relação INNOVANCE VWF Ac/VWF:Ag de 0,7 mantém a especificidade desejada para diagnósticos mais precisos (COLPANI *et al*., 2023). Embora a utilização de 0,6 em ambas as relações tenha apresentado resultados semelhantes em termos de discordâncias, a superioridade do método INNOVANCE VWF Ac justifica a validação e a aplicação de 0,7 como ponto de corte inicial. Essa abordagem minimiza inconsistências e assegura a comparabilidade com as práticas laboratoriais mais atuais. Assim, a implementação do ponto de corte 0,7 deve ser acompanhada de revisões periódicas, permitindo ajustes baseados no desempenho local, garantindo máxima eficiência e alinhamento com padrões científicos globais. Uma das principais limitações deste estudo foi a ausência de dados clínicos e genotípicos dos pacientes incluídos na análise. Essa limitação decorre do delineamento inicial da pesquisa, que teve como objetivo exclusivo a comparação analítica entre metodologias laboratoriais, sem previsão de avaliação de características clínicas individuais (dispensa de TCLE). Uma outra limitação foi o reduzido número de amostras incluídas no presente estudo, principalmente daquelas provenientes de pacientes em uso do DDAVP.

6 CONCLUSÕES

Uma análise dos dados aqui apresentados permite as seguintes conclusões:

a) O método automatizado INNOVANCE VWF Ac apresentou desempenho analítico superior ao ensaio tradicional VWF:RCo. Dentre as principais vantagens observadas destacam-se a maior precisão, a melhor reprodutibilidade e a menor suscetibilidade a erros analíticos relacionados à execução manual. Além disso, o INNOVANCE VWF Ac elimina a necessidade de reagentes biológicos instáveis, favorecendo a padronização diagnóstica e atendendo às demandas atuais por automação e confiabilidade nos testes laboratoriais. Tais características reforçam a aplicabilidade clínica do ensaio automatizado como alternativa mais robusta e eficiente para o diagnóstico da Doença de von Willebrand;

b) Os métodos INNOVANCE VWF Ac e VWF:RCo apresentaram excelente concordância analítica (Coeficiente de Spearman = 0,944, $p<0,05$ e ICC de 0,953 com IC95% = 0,900-0,974);

d) O método INNOVANCE VWF Ac apresentou alta produtividade com automação e interfaceamento;

c) Quanto à influência do grupo sanguíneo e idade sobre os níveis de VWF, foi observada uma tendência ao aumento desse fator nos indivíduos do grupo sanguíneo “Não O” em comparação àqueles do grupo “O”, bem como naqueles com maior faixa etária, confirmando achados prévios da literatura;
d) Apesar do n muito limitado de pacientes em uso de DDAVP, foi possível observar diferentes perfis de resposta, o que certamente implica nas decisões terapêuticas.
e) A análise conjunta dos resultados obtidos no presente estudo justifica a adoção do ponto de corte da relação INNOVANCE VWF Ac/VWF:Ag igual a 0,7 por conferir a especificidade desejada para diagnósticos mais precisos, em consonância com a esperada superioridade do método INNOVANCE VWF Ac.

7 PERSPECTIVA DE ESTUDOS COMPLEMENTARES

O futuro do diagnóstico e manejo da Doença de von Willebrand (DvW) depende da contínua evolução dos ensaios laboratoriais e do aprofundamento das investigações genéticas. A pesquisa sobre subtipos raros da DvW será essencial para validar a precisão dos novos ensaios em cenários clínicos desafiadores, garantindo diagnósticos mais confiáveis. Além disso, a revisão periódica dos pontos de cortes na relação INNOVANCE VWF Ac/VWF:Ag permitirá aprimorar a classificação dos casos, promovendo uma abordagem mais refinada na identificação da doença. No campo terapêutico, a personalização do tratamento torna-se cada vez mais relevante, com a necessidade de avaliar, por exemplo, o uso do DDAVP de acordo com o perfil individual do paciente, levando em consideração a variabilidade na resposta ao tratamento. O avanço na compreensão das variantes genéticas e influências ambientais contribuirá para uma visão mais ampla da DvW como um espectro de distúrbios hemorrágicos, possibilitando intervenções mais eficazes e adaptadas às necessidades de cada paciente. Isso posto, perspectivas de estudos visando o aperfeiçoamento do diagnóstico da DvW são pertinentes e serão bem-vindas.

REFERÊNCIAS

ABDULREHMAN, J. *et al*. Diagnosis of von Willebrand disease: An assessment of the quality of testing in North American laboratories. **Haemophilia**, v. 27, n. 6, 28 ago. 2021.

ABOU-ISMAIL, M. Y. *et al*. Beyond the guidelines: how we approach challenging scenarios in the diagnosis and management of von Willebrand disease. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 21, n. 2, p. 204–214, 1 fev. 2023.

BODÓ, I. *et al*. Platelet-dependent von Willebrand factor activity. Nomenclature and methodology: communication from the SSC of the ISTH. Journal of Thrombosis and Haemostasis, v. 13, n. 7, p. 1345–1350, 9 maio 2015.

BOENDER, J. *et al*. Clinically relevant differences between assays for von Willebrand factor activity. **Journal of thrombosis and haemostasis: JTH**, v. 16, n. 12, p. 2413–2424, 1 dez. 2018.

BOWMAN M, Hopman WM, Rapson D, Lillicrap D & James P (2010) The prevalence of symptomatic von Willebrand disease in primary care practice. **J Thromb Haemost**, 8, 213–216.

CASTAMAN, G.; LINARI, S. Obstacles to Early Diagnosis and Treatment of Inherited von Willebrand Disease: Current Perspectives. **Journal of Blood Medicine**, v. Volume 12, p. 165–175, mar. 2021.

COLPANI, P. et al. A comparative study in patients with type 2 von Willebrand disease using 4 different platelet-dependent von Willebrand factor assays. **Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis**, v. 7, n. 3, p. 100139–100139, 1 mar. 2023.

DE MEYER, S. F. *et al*. von Willebrand Factor. Stroke, v. 43, n. 2, p. 599–606, fev. 2012.

FAVALORO, E. J. von Willebrand Disease: An Update on Diagnosis and Treatment. **Springer eBooks**, p. 77–105, 1 jan. 2023.

FAVALORO, E. J.; PASALIC, L. Laboratory diagnosis of von Willebrand disease in the age of the new guidelines: considerations based on geography and

resources. **Research and practice in thrombosis and haemostasis**, v. 7, n. 5, p. 102143–102143, 1 jul. 2023.

FERREIRA, C. N. *et al*. A cell-based model of coagulation and its implications. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 5, p. 416–421, 2010.

FLOOD, V. H. *et al*. Common VWF exon 28 polymorphisms in African Americans affecting the VWF activity assay by ristocetin cofactor. **Blood**, v. 116, n. 2, p. 280–286, 15 jul. 2010.

FOGARTY, H.; DOHERTY, D.; O'DONNELL, J. S. New developments in von Willebrand disease. **British Journal of Haematology**, v. 191, n. 3, p. 329–339, 12 maio 2020.

FEDERICI, A. B.; CASTAMAN, G.; MANNUCCI, P. M. Guidelines for the diagnosis and management of von Willebrand disease in Italy. **Haemophilia**, v. 8, n. 5, p. 607–621, 28 ago. 2002.

FEDERICI, A. B.; BERNTORP, E.; LEE, C. A. The 80th anniversary of von Willebrand's disease: history, management and research. **Haemophilia**, v. 12, n. 6, p. 563–572, nov. 2006.

FRANCHINI, M. et al. Relationship between ABO blood group and von Willebrand factor levels: from biology to clinical implications. **Thrombosis Journal**, v. 5, n. 1, p. 14, 2007.

HORIUCHI, H. *et al*. Acquired von Willebrand Syndrome Associated with Cardiovascular Diseases. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 26, n. 4, p. 303–314, 1 abr. 2019.

JAMES, P. D. *et al*. ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease. **Blood Advances**, v. 5, n. 1, p. 280–300, 12 jan. 2021.

INTERNATIONAL SOCIETY ON THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS (ISTH). ISTH Bleeding Assessment Tool (BAT): Bleeding assessment and its role in diagnosing von Willebrand disease. Disponível em: https://www.isth.org. Acesso em: [06/01/2025].

KALOT, M. A. *et al*. Von Willebrand Factor Levels in The Diagnosis of von Willebrand Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Blood Advances**, 7 out. 2021.

LAK, M.; PEYVANDI, F.; MANNUCCI, P. M. Clinical manifestations and complications of childbirth and replacement therapy in 385 Iranian patients with type 3 von Willebrand disease. **British Journal of Haematology**, v. 111, n. 4, p. 1236–1239, dez. 2000.

LEEBEEK, F. W. G.; EIKENBOOM, J. C. J. Von Willebrand's Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 21, p. 2067–2080, 24 nov. 2016.

LEISSINGER, C. *et al*. Desmopressin (DDAVP) in the management of patients with congenital bleeding disorders. **Haemophilia**, v. 20, n. 2, p. 158–167, 12 ago. 2013.

LORENZI, TF. **Atlas de Hematologia-Clínica hematológica Ilustrada**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2006. 659p.

MILLER, C. H. *et al*. Measurement of von Willebrand factor activity: relative effects of ABO blood type and race. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 1, n. 10, p. 2191–2197, out. 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Coagulopatias Hereditárias e Plaquetopatias. Brasil, 2016. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_diagnostico_coagulopatias_hereditarias_plaqueopatias.pdf. Acesso em: 30 de nov. 2023.

MOHAMMED, S.; FAVALORO, E. J. Laboratory Testing for von Willebrand Factor Ristocetin Cofactor (VWF:RCo). **Methods in Molecular Biology**, p. 435–451, 2017.

MURRAY, G. P.; POST, S. R.; POST, G. R. ABO blood group is a determinant of von Willebrand factor protein levels in human pulmonary endothelial cells. **Journal of Clinical Pathology**, p. jclinpath-2019-206182, 29 out. 2019.

O'DONNELL, J. *et al*. Genotype at the Secretor blood group locus is a determinant of plasma von Willebrand factor level. **British Journal of Haematology**, v. 116, n. 2, p. 350–356, fev. 2002.

REARDON, B.; PASALIC, L.; FAVALORO, E. J. The Intriguing Relationships of von Willebrand Factor, ADAMTS13 and Cardiac Disease. **Journal of Cardiovascular Development and Disease**, v. 8, n. 9, p. 115, 15 set. 2021.

SADLER, J. E. *et al*. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 4, n. 10, p. 2103–2114, out. 2006.

WARD, S.; O'SULLIVAN, J.; O'DONNELL, J. S. The relationship between ABO blood group, von Willebrand factor and primary hemostasis. **Blood**, v. 136, n. 25, 12 ago. 2020.

WEYAND, A. C.; FLOOD, V. H. Von Willebrand Disease. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 35, n. 6, p. 1085–1101, dez. 2021.

WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA**. Report on the Annual Global Survey 2023**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www1.wfh.org/publications/files/pdf-2525.pdf>.

ZIMMERMANN TS, RUGGERI ZM: Von Willebrand's disease, in Spaet TH ed: **Progress in Hemostasis and Thrombosis, vol 6**. Orlando, FL, Grune & Stratton, 1982, p 203.

Anexo A

TCLE – TERMO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA CIENTÍFICA

Projeto: Avaliação de metodologias automatizadas para o diagnóstico da doença de von Willebrand

Gostaríamos de o(a) convidar a participar de um projeto de pesquisa. A participação neste estudo é voluntária. Você não terá nenhum gasto com participação no estudo. Você tem o direito de escolher não fazer parte ou desistir do estudo em qualquer momento, sem perda de qualquer atendimento a que tem direito na Fundação Hemominas.

Este projeto de pesquisa objetiva avaliar o desempenho de testes diagnóstico para doença de von Willebrand, doença causada por defeito em uma proteína que ajuda a controlar os sangramentos.

Pediremos a você ceder um pouco de sangue (7 ml) para exames laboratoriais. A coleta de sangue em citrato será realizada no ato da doação, sem necessidade de nova punção. Assim, a obtenção da amostra não acarretará em riscos adicionais além daqueles associados ao ato da doação de sangue.

Este material será separado e estocado no Laboratório de Hematologia do Hemocentro de Belo Horizonte e será usado apenas para os propostos na pesquisa. A amostra de sangue coletada será utilizada para dosagem da atividade do antígeno de von Willebrand. O resultado do seu teste, quando disponível, será repassado para você pela equipe de estudo via email. Caso você tenha dúvidas sobre o resultado, poderá entrar em contado com a equipe de pesquisa. Caso haja alguma alteração significativa em seus exames, você será encaminhado para atendimento no ambulatório da Fundação Hemominas.

Existe uma pequena chance de que as informações coletadas sobre você (nome, sexo, idade, grupo sanguíneo ABO, e-mail) possam ter o sigilo quebrado. Entretanto, serão adotadas estratégias para proteger sua privacidade. Suas amostras serão tratadas de forma anonimizada no âmbito do projeto, com uso de códigos e apenas o coordenador terá acesso à identificação dos indivíduos, sendo tal identificação mantida em ambiente restrito (gaveta com chave e/ou computador com senha). Adicionalmente, apenas integrantes do projeto que assinaram o termo de compromisso terão acesso às amostras, bem como aos dados gerados pelo projeto. Em caso de dano causado por sua participação na pesquisa, você tem direito a receber assistência integral, gratuita, inclusive atendimento psicológico, pelo tempo que se fizer necessário, sem custos para você. É garantido ao participante da pesquisa o direito de requerer indenização em caso de danos causados por sua participação na pesquisa.

Você não será identificado quando o sangue coletado for utilizado, seja para propósitos de publicação dos resultados da pesquisa ou publicações educativas, garantindo a você sigilo e privacidade. Este Termo de Consentimento deverá ser rubricado por você e pelo pesquisador responsável pelo projeto. Este termo de Consentimento será elaborado em duas vias, sendo uma para o pesquisador e outra para o você.

Você pode consultar a equipe do projeto a qualquer momento para tirar suas dúvidas. Os contatos estão abaixo. Além disso, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Hemoninas. O CEP protege os participantes e está aberto a tirar as suas dúvidas. Os contatos do CEP também, estão listados ao final desse documento.

Declaração de Consentimento

Declaro que fui informado sobre os métodos e meios de coleta de material a ser utilizado, os problemas, riscos que podem vir a ocorrer em consequência da pesquisa. Dou meu consentimento de livre e espontânea vontade para que eu participe deste projeto de pesquisa.

Nome do participante: _____

_____ _____

Data

_____

Assinatura do pesquisador

Contato com o pesquisador:

Telefone: (31) 3768–4567 – joao.henrique@hemominas.mg.gov.br (João Henrique Fonseca de Moura) – Fundação Hemominas.

Contato do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas – Telefone: (31) 3768 4689 – Email: cep@hemominas.mg.gov.br – Endereço: Alameda Ezequiel Dias, 321, Santa Efigênia, Belo horizonte, Minas Gerais

Anexo B

FUNDAÇÃO HEMOMINAS-MG

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de metodologias automatizadas para o diagnóstico da doença de von Willebrand

Pesquisador: JOAO HENRIQUE FONSECA DE MOURA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 64775822.8.0000.5118

Instituição Proponente: FUND CENTRO HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICOS S.A.

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.926.761

Apresentação do Projeto:

"As informações elencadas nos campos "Apresentação do projeto", "Objetivo da pesquisa" e "Avaliação de riscos e benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas do Projeto (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2006426.pdf).

Segundo o disposto no documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2006426.pdf, a doença de von Willebrand, coagulopatia hereditária mais prevalente na população, é de difícil diagnóstico, o qual necessita de equipe, laboratórios e técnicas especializadas para ser executado. A realização de técnicas não automatizadas pode levar a uma variação intra e interlaboratorial que pode interferir significativamente no diagnóstico da doença, impactando nos indicadores da área da saúde e na qualidademde vida dos pacientes. Nesse sentido, busca-se a padronização e implementação de testes especializados para atendimento da demanda laboratorial dos centros especializados no diagnóstico de coagulopatias hereditárias. O projeto, sob análise, surgiu sob a perspectiva de inovação e adequação do laboratório de Hematologia da Fundação Hemominas frente às novas recomendações e necessidades impostas para investigação e acompanhamento de pacientes com doença de von Willebrand. Nas novas diretrizes ISTH 2021 para diagnóstico de doença de von Willebrand há recomendação do uso de ensaios mais recentes (automatizados) para medir a atividade do fator de von Willebrand (VWF). Com o desenvolvimento deste projeto de pesquisa espera-se avaliar e comparar diferentes técnicas laboratoriais utilizadas para odiagnóstico da doença de von Willebrand. Espera-se que os resultados alcançados permitam que

Endereço: Alameda Ezequiel Dias. 321
Bairro: Santa Efigênia **CEP:** 30.130-110
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3768-4689 **Fax:** (31)3768-4600 **E-mail:** cep@hemominas.mg.gov.br

as informações relativas ao ganho de produtividade, precisão laboratorial e adequações aos protocolos internacionais possam subsidiar decisões técnicas futuras em relação à utilização dos testes mais adequados ao atendimento da demanda de diagnóstico de pacientes. No presente estudo será abordada metodologia comparativa entre o método diagnostico automatizado (recomendação "ASH ISTH NHF WFH 2021 Guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease") e o método não automatizado cofator de ristocetina utilizado pelo laboratório de Hematologia. Serão utilizadas 100 amostras de plasma: 20 amostras normais (10 homens e 10 mulheres - se possível algumas do grupo sanguíneo "O") e 80 amostras patológicas e de pacientes em investigação de doença de Von Willebrand.
Critérios de inclusão: Paciente com Doença de Von Willebrand e em investigação. Indivíduos doadores de sangue maiores de 18 anos triados previamente.
Critérios de exclusão: amostras com volume insuficiente.
Segundo o disposto no documento PB Informações Básicas do Projeto, haverá a retenção de amostras para armazenamento em banco.

Objetivo da Pesquisa:
Objetivo Primário:
Avaliar o desempenho analítico de ensaios de diagnóstico de pacientes com doença de von Willebrand.

Objetivo Secundário:
Avaliar o desempenho analítico de kit comercial baseado na ligação do Fator de von Willebrand à GPIb recombinante em comparação com ensaio Cofator de Ristocetina e Fator de von Willebrand Antígeno (vWF-Ag); Avaliar ganho de produtividade com a automação dos testes para diagnóstico da doença de von Willebrand; Avaliar os resultados positivos e negativos entre as duas técnicas (índice de concordância) considerando o guideline mais recente para diagnóstico da doença de von Willebrand; Avaliar a imprecisão intralaboratorial das técnicas empregadas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Riscos:
Riscos reduzidos. As amostras biológicas utilizadas nessa pesquisa serão obtidas da rotina laboratorial e não haverá recrutamento e coleta exclusivamente para a pesquisa. Não haverá dano direto ao paciente e os resultados decorrentes do estudo serão apresentados de forma agregada,

não permitindo a identificação individual dos participantes.

Benefícios:
Espera-se que os resultados alcançados permitam que as informações relativas ao ganho de produtividade, precisão laboratorial e adequações aos guidelines internacionais possam subsidiar decisões técnicas futuras em relação à utilização dos testes mais adequados ao atendimento da demanda de diagnóstico de pacientes. Considerando o progresso da ciência e da tecnologia haverá benefícios para o paciente e para a comunidade na qual ele está inserido.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
"Estudo nacional e unicêntrico para avaliar o desempenho analítico de ensaios de diagnóstico de pacientes com doença de von Willebrand.
Patrocinador: SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICOS S.A.
País de origem: Brasil
Países participantes: Brasil
Número de participantes a serem incluídos no Brasil:100
Número de participantes a serem incluídos no mundo: Não se aplica
Centros de pesquisa no Brasil: Fundação Hemominas
Armazenamento de amostras em banco de material biológico no Brasil: Sim
Armazenamento de amostras em banco de material biológico fora do Brasil: Não
Previsão de início do estudo: 01/02/2023
Previsão de encerramento do estudo: 01/03/2024

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Fundamentados na Resolução CNS 466/12, os pesquisadores reiteram solicitação anterior relativa à dispensa do TCLE valendo-se dos seguintes argumentos:
"Gostaríamos de reforçar a solicitação de dispensa de TCLE para os pacientes a serem incluídos no estudo. Tal solicitação se justifica com base na Resolução 466/2012, já que, a necessidade de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aumentaria os riscos de quebra de confidencialidade. As amostras de pacientes serão usadas de forma anônima e, o fato de não haver recrutamento e coleta exclusiva para a pesquisa minimiza os riscos, inclusive o de quebra de confidencialidade. Além disso, serão adotadas medidas para minimizar o risco de quebra de

confidencia lidade, já que, só integrantes do projeto estarão envolvidas diretamente e estão cientes dos cuidados. Esclarecemos ainda que, se houver discordância significativa de resultados entre os métodos para os pacientes, o pesquisador informará à chefia do laboratório de hematologia, que reportará para a médica coordenadora do ambulatório. Esse procedimento é necessário uma vez que os pesquisadores não terão acesso à identificação dos pacientes, mas apenas a amostras codificadas. A chefia do Laboratório de Hematologia terá a relação dos pacientes e respectivos códigos, sendo, portanto, capaz de identifica-los. Cabe ressaltar que o acesso à identificação dos pacientes por parte da chefia do laboratório já ocorreria independente do projeto.
Quanto às amostras de doadores, reconhecemos a necessidade de aplicação do TCLE uma vez que haverá necessidade de identificação dos participantes e de coleta exclusiva para o projeto. Assim sendo, apresentamos o TCLE para análise do CEP Hemominas".

Face à solicitação e das justificativas apresentada, o CEP decidiu pela possibilidade de de dispensa do TCLE nos seguintes termos:

Sobre a dispensa do TCLE, o item IV.8 da Resolução CNS nº466/12 afirma que: Nos casos em que seja inviável a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ou que esta obtenção signifique riscos substanciais à privacidade e confidencialidade dos dados do participante ou aos vínculos de confiança entre pesquisador e pesquisado, a dispensa do TCLE deve ser justificadamente solicitada pelo pesquisador responsável ao Sistema CEP/CONEP, para apreciação, sem prejuízo do posterior processo de esclarecimento.
Considerando que os pesquisadores não terão acesso aos dados pessoais dos participantes e, ainda, que não haverá a utilização de fontes secundárias que permitam a identificação dos participantes do estudo, a obtenção do TCLE poderia, de fato, acarretar a quebra da privacidade e da confidencialidade dos dados de tais participantes. Assim sendo, e considerando que no caso de divergência de diagnóstico decorrente da realização da nova técnica o pesquisador informará à chefia do laboratório de hematologia que, por sua vez, reportará para a médica coordenadora do ambulatório (ver documento declaracao_ de_concordancia(1).pdf), o CEP entende ser possível a dispensa do TCLE referente aos pacientes.

Recomendações:
Vide "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomenda-se, também, a necessidade de alteração do cronograma para que o início da pesquisa se dê após a aprovação do CEP, já que, consoante Resolução CNS 466/12, não seria possível a análise e emissão de parecer sobre pesquisas já iniciadas.
O cronograma poderá ser atualizado por meio de emenda.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
Em parecer anterior (nº 5.850.592), o CEP constatou o atendimento a diversas pendências levantadas como condição para a aprovação ética do projeto de pesquisa submetido à análise, conforme abaixo:

"Trata-se de análise de resposta ao parecer pendente nº 5.761.950, emitido pelo CEP em 17/11/2022, no qual constaram os seguintes apontamentos:

1- O cronograma de execução aponta que o estudo seria iniciado em 03/11/2022 e terminaria em 03/08/2024. Todavia, o início do estudo dependeria da aprovação do CEP em obediência ao disposto na Resolução CNS 466/12. Como o CEP não analisa projetos já iniciados, mister se faz a alteração do cronograma de forma que o início das atividades aconteça após a aprovação do CEP Hemominas.

RESPOSTA: Foi realizada a adequação. O projeto não está em execução.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2- Quanto aos riscos, os pesquisadores informam que os riscos seriam reduzidos, sem explicitá-los. Porém, e considerando que, nos termos do item V da Resolução CNS 466/12, toda pesquisa com seres humanos envolve risco em tipos e gradações variados, o CEP entende que os pesquisadores devem informar os riscos envolvidos na realização do estudo (a exemplo do risco de quebra de confidencialidade), bem como as medidas a serem adotadas para minimizá-los.

RESPOSTA: Reconhecemos que existe risco de quebra de confidencialidade. Para minimizar esse risco as amostras de pacientes serão usadas de forma anônima, e o fato de não haver recrutamento e coleta exclusiva para a pesquisa minimiza os riscos, inclusive o de quebra de confidencialidade. Já as amostras de doadores serão coletadas apenas após o consentimento livre

e esclarecido. Essas amostras serão tratadas de forma anonimizada no âmbito do projeto, com uso de códigos e apenas o coordenador terá acesso à identificação dos indivíduos, sendo tal identificação mantida em ambiente restrito (gaveta com chave e/ou computador com senha). Adicionalmente, apenas integrantes do projeto que assinaram o termo de compromisso terão acesso às amostras, bem como aos dados gerados pelo projeto.
A coleta de sangue em citrato será realizada no ato da doação, sem necessidade de nova punção. Assim, a obtenção da amostra não acarretará em riscos adicionais ao doador, além daqueles associados ao ato da doação de sangue. O campo Riscos foi atualizado no formulário PB informações básicas.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3- Recomenda-se a juntada do TCLE de todos os participantes (20 amostras normais -10 Homens e 10 mulheres - se possível algumas do grupo sanguíneo "O"; e 80 amostras patológicas e de pacientes em investigação de doença de Von Willebrand) e, se for o caso, do Termo de Assentimento (ver campo "Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória").

RESPOSTA: Gostaríamos de reforçar a solicitação de dispensa de TCLE para os pacientes a serem incluídos no estudo. Tal solicitação se justifica com base na Resolução 466/2012, já que, a necessidade de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aumentaria os riscos de quebra de confidencialidade. As amostras de pacientes serão usadas de forma anônima e, o fato de não haver recrutamento e coleta exclusiva para a pesquisa minimiza os riscos, inclusive o de quebra de confidencialidade. Além disso, serão adotadas medidas para minimizar o risco de quebra de confidencialidade, já que, só integrantes do projeto estarão envolvidas diretamente e estão cientes dos cuidados. Esclarecemos ainda que, se houver discordância significativa de resultados entre os métodos para os pacientes, o pesquisador informará à chefia do laboratório de hematologia, que reportará para a médica coordenadora do ambulatório. Esse procedimento é necessário uma vez que os pesquisadores não terão acesso à identificação dos pacientes, mas apenas a amostras codificadas. A chefia do Laboratório de Hematologia terá a relação dos pacientes e respectivos códigos, sendo, portanto, capaz de identifica-los.
Cabe ressaltar que o acesso à identificação dos pacientes por parte da chefia do laboratório já ocorreria independente do projeto. Quanto às amostras de doadores, reconhecemos a necessidade

de aplicação do TCLE uma vez que haverá necessidade de identificação dos participantes e de coleta exclusiva para o projeto. Assim sendo, apresentamos o TCLE para análise do CEP Hemominas.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4 - Caso haja a utilização de amostras provenientes de grupo vulnerável (por exemplo menores de 18 anos), solicita-se que os pesquisadores justifiquem a inclusão deste tipo de participante no estudo, tendo em vista o disposto na Resolução CNS 466/2012.

RESPOSTA: As amostras dos pacientes serão tratadas como anônimas, sem olhar idade. Assim é possível que haja inclusão de pacientes menores de idade. O objetivo da pesquisa é avaliar novas tecnologias com possibilidade de melhorar o diagnóstico e acompanhamento de pacientes no futuro. Se formos consultar para identificar pacientes menores de 18 anos haveria quebra de confidencialidade o que implicaria em aumento dos riscos. O resultado da pesquisa será útil para todos, inclusive para menores de 18 anos, pois propõe avanços no diagnóstico e acompanhamento dos pacientes de todas as idades. Diante do exposto, avaliamos que os benefícios da possibilidade de inclusão de pacientes menores de idade superam os eventuais riscos. Em relação aos doadores de sangue, serão incluídos apenas maiores de 18 anos.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5 - Solicita-se que o pesquisador explicite qual resultado será considerado como correto caso haja discordância entre os métodos e como os resultados serão informados aos participantes da pesquisa.

RESPOSTA: Se houver discordância significativa de resultados entre os métodos para os pacientes os pesquisadores informarão à chefia do laboratório de hematologia, que reportará para a médica coordenadora do ambulatório. Esse procedimento é necessário uma vez que os pesquisadores não terão acesso à identificação dos pacientes, mas apenas a amostras codificadas. A chefia do Laboratório de Hematologia terá a relação dos pacientes e respectivos códigos, sendo, portanto capaz de identifica-los. Cabe ressaltar que que o acesso à identificação dos pacientes por parte da chefia do laboratório já ocorreria independente do projeto. Caberá à equipe médica interpretar os

resultados dos testes laboratoriais em conjunto com a clínica do paciente. Os pesquisadores se colocarão a disposição para prestar à equipe médica todos os esclarecimentos sobre os novos testes caso haja necessidade.
Quanto aos doadores de sangue, os resultados serão informados conforme explicitado no TCLE.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

6 - Considerando que há previsão de inclusão de participantes sem a doença de von Willebrand (normais), solicita-se a revisão dos critérios de inclusão.

RESPOSTA: Será incluído nos “critérios de inclusão” indivíduos candidatos à doação de sangue maiores de 18 anos triados previamente (triagem clínica).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

7 - Solicita-se que os pesquisadores esclareçam a forma de obtenção das amostras de doadores de sangue a serem utilizadas no projeto, bem como se as mesmas serão coletadas exclusivamente em decorrência da pesquisa, tendo em vista que usualmente a coleta de amostra biológica em anticoagulante citrato não é obtida no ato da doação de sangue. Caso haja a necessidade da coleta de amostras de doadores em citrato exclusivamente para o estudo, solicita-se que os pesquisadores revejam a metodologia e considerem a aplicação de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aos participantes da pesquisa.

RESPOSTA: A coleta das amostras dos doadores seguirá o padrão de coleta das amostras intituladas no laboratório de hematologia como “pool de amostras para coagulação” que são obtidas conforme POPT.GLA.LHEM-010. Assim sendo, as amostras serão coletadas no ato da doação, sem necessidade de nova punção. Por darmos tratamento individualizado para as amostras dessa pesquisa, aplicaremos o TCLE (ver resposta pendência 3 complementar)

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA."

Todavia, pendência relacionada à explicitação da garantia de ressarcimento ainda se manteve. Assim, restou consignado que: "8 - Quanto ao TCLE apresentado, o CEP Hemominas solicita, com

fundamento no item IV.3, h, da Resolução CNS 466/12 a explicitação da garantia de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa".

Em resposta, os pesquisadores informaram a modificação do TCLE nos seguintes termos:

"Resposta: Foi acrescentado a frase “É garantido ao participante da pesquisa o direito de requerer indenização em caso de danos causados por sua participação na pesquisa” ao TCLE."

Análise: Face à resposta, a pendência foi atendida.

Diante do atendimento das pendências levantadas, o projeto encontra-se aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:
“Prezado(a) pesquisador(a), seu projeto de pesquisa foi aprovado pelo CEP-Hemominas e, conforme definido pela Resolução CNS 466/12 (item XI.2.d) e Resolução CNS 510/16 (art. 28, item V), deve ser acompanhado por meio de relatórios parciais e final. Solicitamos que relatórios parciais sejam apresentados a esse CEP a cada 12 meses a contar a partir da data de aprovação do projeto na Plataforma Brasil. O relatório final deve ser apresentado assim que a pesquisa for encerrada. Os relatórios devem seguir o padrão definido pelo Serviço de Pesquisa da Fundação Hemominas e o formulário a ser utilizado deve ser solicitado pelo e-mail secretaria.pesquisa@hemominas.mg.gov.br. Os relatórios devem ser preenchidos, assinados, digitalizados e submetidos na Plataforma Brasil como "Notificação" para serem analisados pelo CEP-Hemominas.”.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2006426.pdf	06/02/2023 11:10:13		Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_AS_PENDENCIAS_vW06_02_23.pdf	06/02/2023 11:09:37	JOAO HENRIQUE FONSECA DE MOURA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE_VW.pdf	06/02/2023 11:08:23	JOAO HENRIQUE FONSECA DE MOURA	Aceito

Ausência	TCLE_VW.pdf	06/02/2023 11:08:23	JOAO HENRIQUE FONSECA DE MOURA	Aceito
Declaração de concordância	declaracao_de_concordancia.pdf	06/12/2022 12:12:42	JOAO HENRIQUE FONSECA DE MOURA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Solicitacao_de_Isencao_do_Termo_de_Consentimento_Livre_e_Esclarecido_vW.pdf	06/12/2022 09:25:23	JOAO HENRIQUE FONSECA DE MOURA	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_AS_PENDENCIAS_vW.pdf	06/12/2022 09:19:55	JOAO HENRIQUE FONSECA DE MOURA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_von_Willebrand.pdf	06/12/2022 09:19:08	JOAO HENRIQUE FONSECA DE MOURA	Aceito
Outros	Autorizacao_Previa_vW.pdf	31/10/2022 08:51:59	JOAO HENRIQUE FONSECA DE MOURA	Aceito
Outros	Biorrepositorio_vW.pdf	28/10/2022 08:06:36	JOAO HENRIQUE FONSECA DE MOURA	Aceito
Outros	termo_compromisso_vW.pdf	28/10/2022 08:06:06	JOAO HENRIQUE FONSECA DE MOURA	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_vW.pdf	27/10/2022 09:14:24	JOAO HENRIQUE FONSECA DE MOURA	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

BELO HORIZONTE, 06 de Março de 2023

Assinado por:
Maria Clara Fernandes da Silva
(Coordenador(a))

ANEXO C

Diagnosis of von Willebrand Disease: comparison between conventional versus automated assays.

Carvalho, Maria das Graças1; Moura, João Henrique Fonseca1,2; Carvalho, Beatriz Nogueira2; Leonel, Thais Cristine Rodrigues3; Chaves, Daniel Gonçalves4

1.Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy, UFMG, Brazil; 2.Hemominas Foundation - MG, Brazil; 3.Siemens - SP, Brazil; 4. Independent researcher

E.mails: mgcarvalho@farmacia.ufmg.br; joao.henrique@hemominas.mg.gov.br; beatriz.carvalho@hemominas.mg.gov.br; thais.leonel@siemens-healthineers.com; danielgcm@gmail.com

Introduction: One of the biggest challenges in diagnosing von Willebrand disease (VWD) is that the traditionally used Ristocetin Cofactor (VWF:RCo) assay presents high variability, low sensitivity and can be influenced by genetic variants. In addition, the test is highly laborious. The new ISTH 2021 guidelines for VWD diagnosis recommend the use of more recent assays. In this context, the INNOVANCE VWF: Ac kit, fully automated, has emerged.

Objective: To compare the analytical performance of the INNOVANCE VWF: Ac kit (automated method) in relation to the VWF:RCo (Semi-automated method).

Methods: Plasma samples (n=124) from patients with VWD attended at Fundação Hemominas, Brazil, were analyzed. The methods used to determine VWF were VWF:RCo, by aggregometry; INNOVANCE VWF: Ac and von Willebrand Factor Antigen (VWF:Ag), both by turbidimetry, followed by correlation analyses. The study was approved by local Ethics Committee (CAAE:64775822.8.0000.5118) and informed consent was obtained as required.

Results: Table 1 presents the medians (Q1–Q3) for VWF for the VWF:RCo, INNOVANCE VWF:Ac and VWF:Ag methods, as well as the ratios between the results of activity and VWF:Ag. Table 2 shows strong correlation and agreement between the methods, reinforcing the analytical equivalence between them. Compared to VWF:RCo, the reproducibility of INNOVANCE VWF: Ac was highlighted by lower coefficients of variation, indicating greater consistency in the results and operational robustness, in addition to ease of execution and greater sensitivity.

Table 1. Determination of VWF by VWF:RCo (Semi-automated method), by INNOVANCE VWF:Ac (automated method) and VWF:Ag, and the ratios VWF:RCo / VWF:Ag and INNOVANCE VWF:Ac / VWF:Ag.

Variables	n=124
VWF:RCo Median (Q1; Q3)	64.00 (40.25 ; 94.00)
INNOVANCE VWF:Ac Median (Q1; Q3)	71.15 (43.85 ; 105.15)
VWF:Ag Median (Q1; Q3)	74.00 (46.75 ; 108.00)
VWF:RCo / VWF:Ag Median (Q1; Q3)	0.90 (0.80 ; 1.00)
INNOVANCE VWF:Ac / VWF:Ag Median (Q1; Q3)	1.00 (0.90 ; 1.10)

VWF = von Willebrand Factor; VWF:RCo = Ristocetin Cofactor; INNOVANCE VWF:Ac=INNOVANCE Antibody Kit; VWF:Ag = von Willebrand Factor Antigen; Q1=1st quartile; Q3=3rd quartile.

Table 2. Correlations and intraclass correlation indices of agreement between the VWF:RCo, INNOVANCE VWF:Ac and VWF:Ag methods.

Variables	Spearman correlation	Intraclass correlation indices of agreement (ICA)
VWF:Ag x VWF:RCo	0.900*	0.903 (0,818 ; 0,891)**
VWF:Ag x INNOVANCE VWF: Ac	0.931*	0.949 (0,927 ; 0,964)**
VWF:RCo x INNOVANCE VWF: Ac	0.944*	0.953 (0,900; 0,974)**

*p-value <= 0.05 of Spearman's correlation test; **p-value <= 0.05 of ICA test; VWF:RCo = Ristocetin Cofactor; INNOVANCE VWF:Ac = INNOVANCE Antibody Kit; VWF:Ag = von Willebrand Factor Antigen; n=124.

The cutoff point of 0.6 for the VWF:RCo / VWF-Ag and INNOVANCE VWF:Ac / VWF-Ag ratios was the most appropriate, being able to capture a greater number of concordant individuals and fewer discordant individuals in relation to 0.7 (Table 3).

Table 3. Cutoff points for VWF:RCo/VWF:Ag and INNOVANCE VWF:Ac/VWF:Ag ratios.

Cutoff point	Concordant individuals	Discordant individuals
0.6 for both	119 (96.0)	5 (4.0)
0.7 for both	113 (91.2)	11 (8.8)

Conclusion:

The analysis of the results allows us to conclude that the Innovance VWF:Ac assay is a superior analytical alternative to the traditional Ristocetin Cofactor method for laboratory diagnosis of VWD, which implies greater speed and quality in results with consequent benefits to patients.

Funding agencies: Fundação Hemominas, MG, Brazil; CNPq (Brazil)

ANEXO D

Fwd: ISTH 2025: Abstract Acceptance Notification - Poster Presentation

---------- Forwarded message ---------
De: **ISTH Abstracts** <abstracts@isth.org>
Date: qua., 26 de mar. de 2025 às 17:20
Subject: ISTH 2025: Abstract Acceptance Notification - Poster Presentation
To: mgcwanner@gmail.com <mgcwanner@gmail.com>

Dear Maria das Graças Carvalho**,**

Thank you for submitting an abstract to the 33rd Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis to be held in Washington, D.C., U.S. from June 21 – 25, 2025.

On behalf of the Scientific Program Committee and the Annual Congress Planning Committee, we are pleased to inform you that the following abstract(s) have been **accepted** for a **Poster Presentation.** This decision was based on reviews by multiple experts in the field who assessed the scientific value of the content and its suitability for this meeting.

Your presentation will be held live and onsite in Washington, DC. There will be no virtual abstract presentations permitted. If you are not planning to attend in person, please change the presenting author to a co-author who will be in person via your tasks by **May 9, 2025** – see below for more information.

POSTER PRESENTATION DETAILS

Presentation Title: Diagnosis of von Willebrand Disease: comparison between conventional versus automated assays.

Abstract Presentation/Board Number: PB0156

Date and Time of Poster Presentation: 6/22/2025 at 13:45 – 14:45

Poster Location: Exhibition Hall (Note: Poster boards will be labeled by presentation number in numerical order)

Please note that, due to many variables involved, we are not able to change presentation dates or times. If you are unable to attend the above date and time, it is suggested that you assign a new presenting author.