

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Letícia Lemos Jardim

AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOLÓGICO DE PACIENTES COM HEMOFILIA RECÉM-DIAGNOSTICADA

Belo Horizonte

2015

Letícia Lemos Jardim

**AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOLÓGICO DE PACIENTES COM HEMOFILIA
RECÉM-DIAGNOSTICADA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.

Orientadora: Prof(a) Dra. Suely Meireles Rezende

Co-Orientador: Dr. Daniel Gonçalves Chaves

Belo Horizonte

2015.

J37a Jardim, Leticia Lemos.
Avaliação do perfil imunológico de pacientes com hemofilia recém-diagnosticada [recurso eletrônico]. / Leticia Lemos Jardim. - - Belo Horizonte: 2015.
76f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Suely Meireles Rezende.
Coorientador (a): Daniel Gonçalves Chaves.
Área de concentração: Hemostasia.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Hemofilia A. 2. Micropartículas Derivadas de Células. 3. Citocinas. 4. Quimiocinas. 5. Imunofenotipagem. 6. Dissertação Acadêmica. I. Rezende, Suely Meireles. II. Chaves, Daniel Gonçalves. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WH 325

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO
ADULTO

UFMG

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA LETÍCIA LEMOS JARDIM

Realizou-se, no dia 12 de junho de 2015, às 14:00 horas, Sala 062, andar térreo da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada **AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOLÓGICO DE PACIENTES COM HEMOFILIA RECÉM-DIAGNOSTICADA**, apresentada por **LETÍCIA LEMOS JARDIM**, número de registro 2013654574, graduada no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, à seguinte Comissão Examinadora: Prof^a. Suely Meireles Rezende - Orientadora (UFMG), Prof. Daniel Gonçalves Chaves - Coorientador (HEMOMINAS), Prof. Adriano de Paula Sabino (UFMG), Prof. Olindo Assis Martins Filho (FIOCRUZ).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, foi lavrada a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 12 de junho de 2015.

Prof^a. Suely Meireles Rezende (Doutora)

Prof. Daniel Gonçalves Chaves (Doutor)

Prof. Adriano de Paula Sabino (Doutor)

Prof. Olindo Assis Martins Filho (Doutor)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor

Prof. Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitora

Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Prof. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

Pró-Reitora de Pesquisa

Profa. Adelina Martha dos Reis

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Chefe do Departamento de Clínica Médica

Prof. Unai Tupinambas

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO

Coordenadora

Profa. Teresa Cristina Abreu Ferrari

Sub-coordenador

Prof. Paulo Caramelli

Colegiado

Profa. Tereza Cristina Abreu Ferrari

Profa. Valéria Maria Azeredo Passos

Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho

Prof. Paulo Caramelli

Prof. Francisco Eduardo Costa Cardoso

Prof. Marcus Vinícius Melo de Andrade

*À memória de meu pai, Antônio Jardim,
responsável por tudo de melhor que há em mim.*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Suely Rezende pela oportunidade e confiança no meu trabalho. Sou muito grata por conduzir a orientação com tanto carinho e sabedoria.

Ao Dr. Daniel Chaves pela disponibilidade e pela generosidade em compartilhar seu conhecimento.

Ao Igor, pela presença e apoio incondicional. Saber que posso contar com você me faz mais forte.

À Dani e Ricardo, não só pelo incentivo e enorme ajuda, mas, principalmente, pela vida dos pequenos Guilherme e Camila, afilhados que trazem luz e alegria a tudo que faço.

Aos amigos da Hematologia Molecular, Dra. Sandra, Valéria e Danilo, pela convivência saudável, oportunidade de crescimento e parceria.

Ao Roger Franco pela amizade acompanhada de boas conversas.

À Laura Aisha Paulino pela dedicação e ajuda durante sua iniciação científica.

Ao Dr. Marcio Portugal pela presença sempre positiva e enorme contribuição.

Aos colaboradores do Hemorio, Hemepar e Hemoes.

A todos do laboratório de pesquisa da Fundação Hemominas pela boa receptividade durante os experimentos realizados.

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho e a todos do laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do René Rachou/FIOCRUZ por gentilmente permitirem a utilização do laboratório para a dosagem de micropartículas. Em especial a Amanda Cardoso Cassette pela ajuda fundamental nas dosagens imunológicas, sou muito grata por tudo.

À Dra. Ana Cristina Simões pela gentileza na cessão dos controles e contribuição com seu conhecimento.

Aos familiares dos pacientes participantes por acreditarem na seriedade do nosso trabalho.

A Capes e a Fapemig pelo apoio financeiro.

RESUMO

A hemofilia congênita é uma doença hemorrágica resultante da deficiência dos fatores VIII (FVIII) na hemofilia A ou IX (FIX) na hemofilia B. Indivíduos com hemofilia necessitam de infusões frequentes de concentrados de FVIII ou FIX para profilaxia e/ou tratamento das hemorragias, entretanto, durante o tratamento, cerca de 30% e 5% dos pacientes com hemofilia A e B, respectivamente, desenvolvem anticorpos (inibidores) que inibem a atividade coagulante do fator infundido, promovendo a ineficácia da reposição de fator. A fisiopatologia relacionada ao desenvolvimento de inibidores é pouco compreendida. Estudos anteriores avaliaram o perfil imunológico de pacientes com hemofilia, mas nenhum estudo acompanhou este perfil em diferentes fases da doença. Esse projeto tem como objetivo traçar o perfil imunológico de pacientes com hemofilia recém-diagnosticada, previamente não tratados com o concentrado de fator deficiente. Para isso, 32 pacientes foram incluídos nos hemocentros de Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná e Rio de Janeiro, dos quais 28 (87,5%) com hemofilia A e 4 pacientes (12,5%) com hemofilia B. No momento da inclusão, 22 (68,8%) não haviam recebido nenhuma dose de fator e 10 (31,2%) tiveram, no máximo, 4 dias de exposição ao fator. O perfil fenotípico leucocitário de 19 (59,4%) pacientes foi avaliado a partir de imunofenotipagem por citometria de fluxo. Além disso, foram dosadas citocinas, quimiocinas e micropartículas (MPs) de 28 (87,5%) pacientes com hemofilia A (PHA) e 47 controles, também por citometria de fluxo. Observamos que o perfil fenotípico leucocitário em pacientes com hemofilia recém-diagnosticada é heterogêneo. Os níveis de MPs de plaquetas, leucócitos totais, linfócitos T, neutrófilos, monócitos e eritrócitos nos pacientes virgens de fator (ODE) foram maiores quando comparados aos controles ($p < 0,05$). Também observamos maiores níveis de IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10 e menores níveis de MIG nos pacientes quando comparados aos controles ($p < 0,05$). Os pacientes com mais de um dia de exposição ($> 1DE$) apresentaram níveis elevados de IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF, IFN- γ e IL-2 com relação aos controles, além de uma redução nos níveis de MIG. Em conclusão, verificamos que o perfil imunológico modulado por citocinas e quimiocinas difere entre pacientes que nunca tiveram contato com o FVIII, pacientes que receberam até 4 dias de exposição ao fator VIII e grupo controle, sugerindo uma resposta imunológica modulada a partir da tentativa de controle da hemostasia nos pacientes com hemofilia A.

Palavras-chave: hemofilia, micropartículas, citocinas, quimiocinas, imunofenotipagem

ABSTRACT

Congenital hemophilia is a hemorrhagic disease resulted from deficiency of factor VIII (FVIII) in hemophilia A or IX (FIX) in individuals with hemophilia B. Hemophilia requires frequent infusions of FVIII or FIX concentrates for prophylaxis and/or treatment of hemorrhage. However, during treatment, approximately 30% and 5% of patients with hemophilia A and B, respectively, develop antibodies (inhibitors) which inhibit the coagulant activity of the infused factor promoting ineffective factor replacement. The pathophysiology related to the development of inhibitors is poorly understood. Previous studies have evaluated the immune profile of patients with hemophilia, but no study followed this profile at different stages of the disease. This project aims to evaluate the immunological profile of previously untreated patients before the start of factor replacement. For this, 32 patients were included in the hemophilia centers of Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná and Rio de Janeiro, of which 28 (87.5%) with hemophilia A and 4 patients (12.5%) with hemophilia B. Upon inclusion, 22 (68.8%) patients received no factor VIII infusion and 10 (31.2%) had at most 4 days of exposure to factor VIII. The leukocyte phenotypic profile of 19 (59.4%) patients was assessed by using flow cytometry immunophenotyping. Furthermore, we also measured cytokines, chemokines and microparticles (MPs) in 28 (87.5%) patients with hemophilia A (PHA) and 47 controls, also by flow cytometry. We observed that the phenotypic profile of leukocytes in patients with hemophilia A is heterogeneous. Increased levels of MPs of platelets, leukocytes, T lymphocytes, neutrophils, monocytes and erythrocytes were found in previously untreated patients (0DE) when compared to controls ($p < 0.05$). We also observed higher levels of IL-4, IL-6, IL-8 and IL-10 and lower levels of the MIG patients compared to controls ($p < 0.05$). Patients with more than one exposure day to factor VIII (>1DE) showed elevated levels of IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF, IFN- γ and IL-2 compared to controls, including a reduction in the levels of MIG. In conclusion, we found that the immune profile modulated by cytokines and chemokines differ between previously untreated patients with hemophilia A, patients who had less than four exposure days to factor VIII and control group. This suggests that an immune response develops as a result from the attempt to control hemostasis in patients with hemophilia.

Keywords: hemophilia, microparticles, cytokines, chemokines, immunophenotyping

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Modelo de cascada da coagulação.....	15
Figura 2. Estrutura do gene e da proteína do fator VIII	18
Figura 3. Delineamento do estudo original.....	30
Figura 4. Orientação para identificação de amostras	32
Figura 5. Perfil fenotípico leucocitário	45
Figura 6. Distribuição de micropartículas por grupo analisado	48
Figura 7. Distribuição de citocinas por grupo analisado	51
Figura 8. Distribuição de citocinas por grupo analisado.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Coleta de amostra biológica.....	33
Tabela 2. Marcadores utilizados na realização da imunofenotipagem por paciente.....	36
Tabela 3. Marcadores para avaliação de leucócitos	36
Tabela 4. Anticorpos utilizados para a dosagem de micropartículas.....	38
Tabela 5. Características clínicas da população estudada	43
Tabela 6. Dosagem de micropartículas em pacientes e controles.....	47
Tabela 7. Dosagem de citocinas em pacientes e controles.....	50
Tabela 8. Dosagem de quimiocina em pacientes e controles.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APC:** Célula apresentadora de antígeno
- APC:** Allophycocyanin
- Arg:** Arginina
- AT:** Antitrombina
- CBA:** *Cytrometric Bead Array*
- CD:** *Cluster of differentiation*
- DE:** *Dias de exposição*
- F8:** Gene do fator VIII
- F9:** Gene do fator IX
- FV:** Fator V da coagulação
- FVa:** Fator V ativado
- FVII:** Fator VII da coagulação
- rFVIIa:** Fator VII recombinante ativo
- FVIII:** Fator VIII da coagulação
- FVIIIa:** Fator VIII ativado
- FIX:** Fator IX da coagulação
- FIXa:** Fator IX ativado
- FX:** Fator X da coagulação
- FXa:** Fator X ativado
- FT:** Fator tecidual
- FvW:** Fator de von Willebrand
- HIV:** *Human Immunodeficiency Virus*
- HLA:** Complexo maior de histocompatibilidade humano
- Ig:** Imunoglobulina
- IgG:** Imunoglobulina de classe G
- IL-2:** Interleucina 2
- IL-4:** Interleucina 4
- IL-6:** Interleucina 6
- IL-8:** Interleucina 8
- IL-10:** Interleucina 10
- IL-17:** Interleucina 17
- IFN- γ :** Interferon-gamma

INT22: Intron 22

IP10: *Interferon-inducible protein* / Mesmo que CXCL10

kDa: Kilodalton

Kb: Kilobase

MCP1: *Monocyte Chemotactic protein-1* / Mesmo que CCL2

MFF: Solução fixadora

MIG: *Monokine induced by gamma interferon* / Mesmo que CXCL9

MPS: Micropartículas

mRNA: RNA mensageiro

NK: Célula *Natural Killer*

PB: Pares de bases

PBS-W: Tampão fosfato suplementado com 0,5% de soro-albumina bovina e 0,1% de azidasódica

PC: Proteína C

PS: Proteína S

RANTES: *Regulated on activation normal T cell expressed and secreted*

RNA: Ácido ribonucleico

Th: Célula T auxiliar

TNF: Fator de necrose tumoral

TP: Tempo de protrombina

TTPa: Tempo de tromboplastina parcial ativado

TFPI: Inibidor da via do fator tecidual

UB: Unidade Bethesda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. A coagulação sanguínea	14
1.2. Fator VIII da coagulação	16
1.3. As hemofilias	19
1.4. Inibidor em hemofilia	21
1.5. Imunologia e hemofilia	24
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo Geral	28
2.2. Objetivos Específicos.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Desenho do Estudo	30
3.2. Locais do Estudo	30
3.3. População de Estudo.....	31
3.4. Considerações éticas do estudo	32
3.5. Coleta de amostras	33
3.6. Testes laboratoriais.....	33
3.6.1. Determinação da atividade coagulante dos fatores VIII e IX.....	33
3.6.2. Análise do perfil imunológico	34
3.6.2.1. Análise fenotípica leucocitária em sangue periférico.....	35
3.6.2.2. Análise de micropartículas	37
3.6.2.3. Dosagem de citocinas e quimiocinas plasmáticas	38
3.7. Plano de coleta e análise de dados	39
4. RESULTADOS	40
4.1. Pacientes	41
4.2. Características da população estudada	41
4.3. Perfil imunológico	44
4.3.1. Perfil fenotípico leucocitário.....	44
4.3.2. Dosagem de micropartículas.....	46
4.3.3. Dosagem de citocinas.....	49
4.3.4. Dosagem de quimiocinas	52
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1. INTRODUÇÃO

1.1. A coagulação sanguínea

A hemostasia é um mecanismo dinâmico e vital que, além de preservar a fluidez sanguínea nos vasos, também impede o extravasamento de sangue para outros tecidos. Esse mecanismo é mantido por proteínas plasmáticas, sintetizadas principalmente pelos hepatócitos na forma inativa, também chamadas de zimogênios. A hemostasia primária é a resposta inicial à interrupção na integridade do fluxo sanguíneo, mediada principalmente pela ativação plaquetária. A hemostasia secundária é caracterizada pela ativação de outros fatores plasmáticos que interagem para a formação do coágulo (MARCUS & SAFIER, 1993).

Em 1964, Macfarlane e Davie & Ratnoff propuseram um “modelo de cascata” que descreve os mecanismos da coagulação sanguínea a partir de um sistema de amplificação (Figura 1). Para cada fator existe uma pró-enzima que pode ser convertida em uma enzima ativa, de forma que a ativação de um zimogênio promove a catalisação do próximo fator e assim por diante. Esse modelo propõe a existência de duas vias, intrínseca e extrínseca, e foi aceito por quase cinquenta anos. Além de explicar a interação dos fatores e proporcionar um avanço significativo na compreensão dos mecanismos da coagulação, ele também permitiu o desenvolvimento de metodologias laboratoriais, como o tempo de protrombina (TP), para avaliação das vias extrínseca e comum, e o tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa), para avaliação das vias intrínseca e comum. No entanto, apesar dos benefícios, este modelo não reflete a fisiologia da hemostasia *in vivo*. A “cascata de coagulação” defende a idéia de que as duas vias atuam de forma independente, mas não explica o motivo de uma via não compensar alguma falha ocorrida na outra. Por exemplo, a deficiência dos componentes iniciais da via intrínseca, como pré-caliceína e fator XII (FXII), associam-se ao alargamento do TTPa, mas não às manifestações hemorrágicas. Por outro lado, pacientes que possuem deficiência de componentes como fator IX (FIX) e fator VIII (FVIII) apresentam graves casos de hemorragia apesar da via extrínseca normal, caso semelhante ao dos pacientes com deficiência do FVII, quando a ativação do fator X (FX) pela via intrínseca não supre os quadros hemorrágicos (GAILANI & RENNE, 2007; HOFFMAN & MONROE, 2007; SMITH, 2009; FERREIRA et al., 2010).

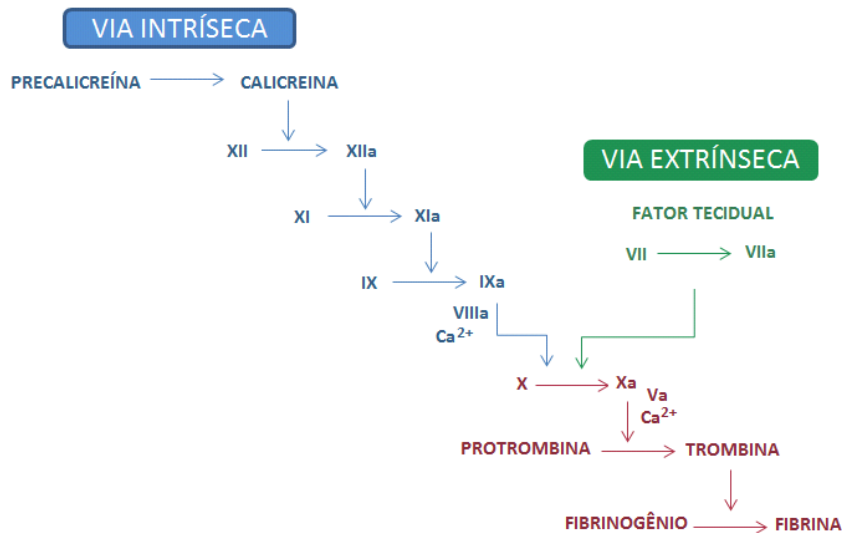


Figura 01. Modelo da cascata de coagulação. Representação das vias intrínseca e extrínseca. Modificado de HOFFMAN, MONROE, 2001.

Em 2003, Hoffman propôs o “modelo celular” que explica a fisiologia da hemostasia através da interação dos fatores de coagulação com a superfície celular. Esse modelo é composto de três etapas: iniciação, amplificação e propagação. Na fase de iniciação, as células extravasculares, carreadoras do fator tissular (FT), entram em contato com componentes do sangue. O FT ativa o FVII que, por sua vez, ativa os FIX e FX, culminando na formação de pequenas quantidades de trombina. Na fase de amplificação, a trombina ativa parcialmente as plaquetas, que têm seus receptores e sítios expostos para ligação a fatores da coagulação. Nessa fase também há a ativação do fator V (FV), FVIII e FIX. O FV é responsável por clivar a ligação entre o FVIII e fator von Willebrand (FvW), dissociando o complexo e permitindo que o FvW atue como mediador na adesão plaquetária. Por fim, a etapa de propagação ocorre na superfície das plaquetas agregadas ao local da lesão, onde existe a formação do complexo tenase (FIX – FVIII – FX) e do complexo protrombinase (FX – FV), levando à conversão de grandes quantidades de protrombina em trombina e, conseqüentemente, resultando na formação do coágulo de fibrina (HOFFMAN, 2003).

Para evitar que o processo de coagulação resulte na obstrução do vaso, alguns anticoagulantes naturais como o inibidor da via do fator tecidual (TFPI), a proteína C (PC), a proteína S (PS) e a antitrombina (AT), atuam inativando alguns fatores da coagulação (FERREIRA et al., 2010).

1.2. Fator VIII da coagulação

O gene que codifica o fator VIII, *F8*, está localizado na extremidade do braço longo do cromossomo X (Xq28) (Figura 2a), totalizando cerca de 0,1% de todo o cromossomo. É composto por 186.000 pares de bases (pb), divididos entre 25 *íntrons* e 26 *éxons* (Figura 2b). Os *íntrons* representam cerca de 95% do gene, com aproximadamente 177 Kilobases (Kb) e os *éxons* geram um RNA mensageiro de 9 Kb (Figura 2c). (GITSCHIER et al., 1984).

O *íntron 22* (INT22) possui o maior número de pares de bases de todo o *F8*, com 32 Kb, e apresenta uma região CpG situada a 10 Kb do *éxon 22*, que pode funcionar como região promotora bidirecional para dois transcritos: *F8A* e *F8B*. O gene *F8A* possui 1,8 Kb e é transcrito em direção oposta ao *F8*, enquanto o *F8B*, que é transcrito no mesmo sentido do *F8*, possui 2,5 Kb. A função do *F8A* e *F8B* ainda é desconhecida, no entanto, sabe-se que cerca de 50% dos casos de hemofilia A classificados como grave são decorrentes de um rearranjo molecular que leva à inversão do *íntron 22* (NAYLOR et al., 1992). Essa mutação é decorrente de uma recombinação entre uma região de 9,5 Kb do *íntron 22* (Int22h1) e uma de duas cópias homólogas do gene *F8A* (denominadas Int22h2 e Int22h3) presentes a aproximadamente 500 Kb em direção ao telômero (ANTONARAKIS et al., 1995). Outra inversão, presente em cerca de 5% dos casos de hemofilia A grave, foi encontrada no *íntron 1* e descrita por Bagnall e colaboradores (2002).

O RNA mensageiro (mRNA) do *F8* possui duas regiões não traduzidas, uma de 150 pb na extremidade 5' e outra de 1.806 pb na extremidade 3'. A janela de leitura aberta é composta por 7.056 pb e codifica uma proteína precursora de cadeia única contendo 2.351 aminoácidos. Desses, 19 correspondem à sequência de um peptídeo sinal que é clivado durante a passagem da proteína pelo retículo endoplasmático, resultando em uma proteína madura de 2.332 aminoácidos e aproximadamente 265 Kilodalton (kDa) (WOOD et al., 1984).

A estrutura primária do FVIII consiste nos domínios A, B e C (NH₂-A1-*a*1-A2-*a*2-B-*a*3-A3-C1-C2-COOH), que são ligados por íon metal e classificados em uma cadeia pesada (A1-A2-B) e uma cadeia leve (A3-C1-C2) (Figura 2d). O FVIII circula no plasma

conjugado ao FvW através de ligação ao domínio C2. Esse complexo não-covalente garante estabilidade ao FVIII que, ao ser dissociado, é rapidamente degradado na circulação (WOOD et al., 1984; JACQUEMIN & AINT-REMY, 1998) (Figura 2e). A ativação por proteólise do FVIII é resultado da clivagem desse fator pela trombina entre os domínios A1 e A2, na posição Arg372, sítio a1; entre os domínios A2 e B, na posição Arg740, sítio a2 e, também, entre os domínios B e A3, na posição Arg1.689, sítio a3. A forma ativa (FVIIIa) se dissocia do FvW e se liga ao FIX e a fosfolipídios de membrana (VEHAR et al., 1984) (Figura 2f).

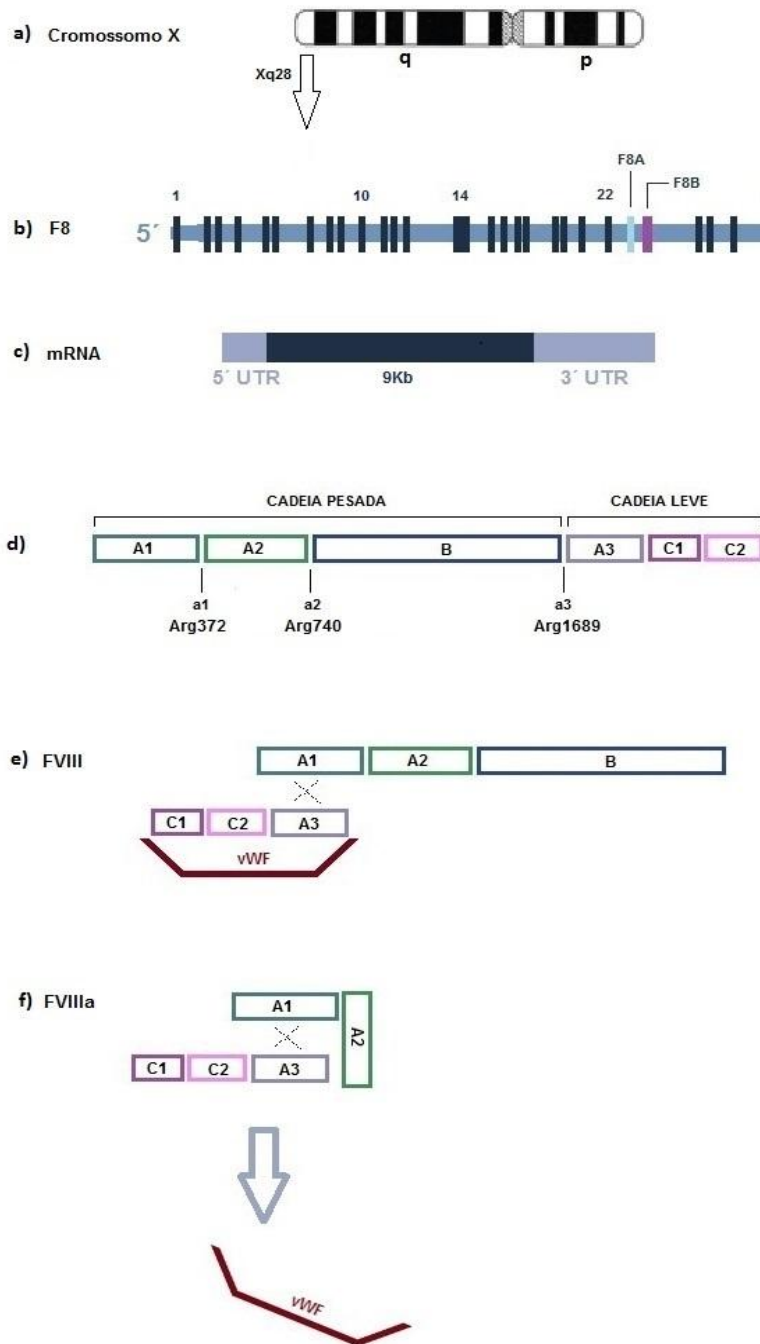


Figura 2. Estrutura do gene e da proteína do Fator VIII.

a) Localização no cromossomo X (Xq28); b) Gene F8, composto por 26 *éxons* e os transcritos F8A e F8B, localizados na região do *íntron* 22; c) Formação do RNA mensageiro, com duas regiões não codificadoras (5'UTR e 3'UTR); d) Estrutura primária da proteína FVIII, representando os domínios A1, A2, B, A3, C1 e C2 e os pontos de quebra nas regiões a1, a2 e a3; e) Proteína na forma inativa, associada ao FvW; f) Ativação da proteína devido a clivagem pela trombina e dissociação do FvW (LAVIGNE-LISSALDE et al, 2009; KAUSHANSKY et al, 2011. Modificado).

1.3. As hemofilias

A hemofilia é uma doença hemorrágica hereditária, ligada ao cromossomo X, caracterizada pela deficiência do fator VIII (hemofilia A) ou do fator IX (hemofilia B). As hemofilias A e B acometem, respectivamente, 1:10.000 e 1:35.000 nascidos vivos do sexo masculino (REZENDE, 2010).

A apresentação clínica das hemofilias A e B é semelhante, caracterizada principalmente por sangramentos intra-articulares (hemartroses) e hemorragias musculares (hematomas) (PIO et al., 2009). Os episódios hemorrágicos podem surgir espontaneamente ou após traumas, e variam de acordo com a atividade residual coagulante do fator VIII ou do fator IX. Pacientes com níveis circulantes inferiores a 1% do normal possuem a forma grave da doença, apresentando hemartroses frequentes. Os pacientes com hemofilia moderada possuem atividade do fator deficiente entre 1% e 5% do normal e apresentam quadros hemorrágicos mais brandos, principalmente após traumas, podendo também apresentar sangramentos espontâneos, mas com menor frequência do que entre os pacientes com a forma grave da doença. A hemofilia leve é caracterizada por níveis de fator entre 5% e 40% do normal e resulta em sangramentos mais comumente após traumas e/ou procedimentos invasivos/cirúrgicos (ANTONARAKIS et al., 1995; WHITE et al., 2001).

A maior parte das alterações genéticas relacionadas ao desenvolvimento da hemofilia A são decorrentes de mutações de ponto, seguidas pelas deleções, inserções e, então, as inversões no gene *F8*, como as inversões dos *íntrons* 1 e 22 (PIO et al., 2009). As alterações genéticas mais comuns na hemofilia B são mutações de ponto, sendo em sua maioria do tipo troca de sentido (MUKHERJEE et al., 2008). Também são observadas deleções, inserções e mutações sem sentido. Mutações que resultam na ausência do produto gênico parecem estar relacionadas ao alto risco para desenvolvimento de inibidor em hemofilia B, no entanto, esses dados ainda não são totalmente esclarecidos (WARRIER & LUSHER, 1998; DIMICHELE, 2002).

O diagnóstico laboratorial das hemofilias A e B deve ser suscitado mediante alargamento do tempo de TTPa, com TP normal. O diagnóstico confirmatório requer a realização da dosagem dos fatores VIII e IX no plasma por meio da realização de testes

funcionais (mais frequentemente) e/ou antigênicos da coagulação. Nas hemofilias leves, o TTPa pode estar normal.

Ainda não existe cura para as hemofilias. Assim, seu tratamento está basicamente fundamentado na administração de concentrados dos fatores deficientes (VIII ou IX) em resposta aos episódios hemorrágicos ou para preveni-los (GILLES et al., 1993). Esses concentrados de fator podem ser provenientes de plasma, isto é, purificados a partir do plasma humano, ou de origem recombinante. Os fatores recombinantes são classificados de acordo com o material utilizado em sua produção e sua meia vida de atuação. Fatores recombinantes de primeira e segunda geração são confeccionados utilizando material biológico em sua composição, ao contrário dos fatores de terceira geração, que possuem seu processo de formulação e obtenção completamente livre de proteínas de origem humanas ou animal.

Pacientes com hemofilia grave devem receber infusões profiláticas de concentrado de fator VIII ou IX de 1 a 3 vezes por semana, procedimento que deve ser iniciado por volta de 1 a 2 anos de idade, antes da ocorrência da segunda hemartrose (profilaxia primária) (BERNTORP et al., 2003).

Além dos episódios hemorrágicos e suas complicações agudas, os pacientes com hemofilia sofrem especialmente de três tipos potenciais de complicações crônicas: (i) as artropatias, que ocorrem em decorrência dos sangramentos intra-articulares recorrentes e podem levar à deficiência motora permanente; (ii) as doenças infecciosas transmitidas por produtos derivados do plasma, das quais a contaminação pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e as hepatites B e C são os principais problemas, e (iii) o desenvolvimento de aloanticorpos (inibidores) que inibem a função coagulante dos fatores VIII ou IX. Atualmente, em países que possuem programas para hemofilia bem estabelecidos, a ocorrência da artropatia hemofílica e infecção por HIV, hepatites B e C são praticamente inexistentes, em função do advento da profilaxia primária e dos processos eficientes de redução e inativação viral dos hemoderivados plasmáticos industrializados, respectivamente. Além disso, o advento dos concentrados de fator de origem recombinante tornou inexistente a contaminação viral por agentes conhecidos transmitidos pelo plasma humano. Assim, hoje, em países

com bons programas de hemofilia, sua principal complicação é o desenvolvimento de inibidores, que leva ao aumento da morbimortalidade, dos custos em relação ao tratamento da hemofilia e piora na qualidade de vida dos indivíduos acometidos.

1.4. Inibidores em hemofilia

Os inibidores são anticorpos policlonais da classe IgG (aloanticorpos), que atuam através do bloqueio funcional dos epitopos das proteínas do FVIII e FIX, neutralizando a atividade terapêutica do fator infundido (EHRENFORTH et al., 1992).

A incidência dos inibidores é de aproximadamente 33% em pacientes com hemofilia A e 7,5% em pacientes com hemofilia B (DIMICHELE, 2002). A prevalência entre todos os pacientes com hemofilia A e B é de 10%-30% e 1%-5%, respectivamente (DIMICHELE, 2002; GOUW et al., 2007a).

Deve-se suspeitar do desenvolvimento de inibidor quando a resposta terapêutica ao fator deficiente (VIII ou IX) passa a ser menos efetiva ou não efetiva. A ocorrência de hemorragias com maior frequência e difícil controle e o aumento no consumo de concentrado de fator sugerem a presença de inibidor. Entretanto, alguns pacientes podem não apresentar manifestações clínicas evidentes. Nesses casos, o diagnóstico pode ser confirmado através de testes laboratoriais de rotina (DIMICHELE, 2008).

Os testes de triagem para identificação de inibidor devem ser realizados, preferencialmente, com pelo menos três dias de intervalo das infusões do concentrado do fator deficiente, quando os níveis plasmáticos de fator estiverem mais baixos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Os mesmos devem ser repetidos a cada 10 dias de exposição ao concentrado de fator até o 50º dia de exposição e, então, a cada 6 a 12 meses, sendo considerado um dia de exposição (DE) cada dia do calendário que o paciente receber a infusão de fator, independente do volume e da quantidade de doses administradas. O teste também deve ser realizado previamente a qualquer procedimento cirúrgico ou invasivo ou em qualquer ocasião em que o paciente não esteja apresentando boa resposta ao tratamento (MINISTERIO DA SAÚDE, 2009).

Quando o teste de triagem for positivo, o diagnóstico deve ser confirmado através do teste de Bethesda, primeiramente proposto por Kasper (KASPER, 1975) e modificado em 1995, por Verbruggen e colaboradores (VERBRUGGEN et al., 1995). As modificações para o teste de Bethesda foram sugeridas com o intuito de reduzir os resultados falso-positivos, aumentando a especificidade do teste. A alteração ficou conhecida como variação de Nijmegen ou teste de Bethesda modificado. Por definição, uma unidade Bethesda (UB) inibe 50% da atividade do FVIII ou FIX presente no plasma (WHITE et al., 2001).

Atualmente os inibidores são considerados de origem multifatorial, mas o motivo pelo qual alguns pacientes com hemofilia desenvolvem uma resposta imunológica e outros não ainda é desconhecido (EHRENFORTH et al., 1992). Os principais fatores de risco descritos envolvem o tipo e a gravidade da hemofilia, a mutação associada e a intensidade da infusão com concentrados de fator (GOUW et al., 2007b; 2007c). Pacientes cuja primeira exposição ao fator deficiente ocorre de forma intensiva, como nos casos de cirurgias ou sangramentos graves, possuem maior risco de desenvolver inibidor (GOUW et al., 2007c). Por outro lado, pacientes que utilizam o fator terapêutico de forma profilática apresentam uma redução de até 60% no risco de desenvolvimento de inibidor (GOUW et al., 2007b; 2013b).

Existem relatos da associação entre o desenvolvimento de inibidor e o tipo de concentrado de fator utilizado. Goudemand e colaboradores sugerem que pacientes tratados com FVIII recombinante possuem maior risco de desenvolvimento de inibidor quando comparado a pacientes tratados com FVIII plasmático (GOUEMAND et al., 2006). Entretanto, outros estudos discordam e relatam que o tipo de fator infundido, por si só, não se associa ao desenvolvimento de uma resposta imunológica (GOUW et al., 2007a; 2013a). Três estudos recentemente publicados demonstraram que uma determinada marca de concentrado de fator recombinante de segunda geração se associou a um maior risco de desenvolvimento de inibidor (GOUW et al., 2013a; CALVEZ et al., 2014; COLLINS et al., 2014).

Com relação aos fatores de risco genéticos, vários estudos sugerem associação entre a mutação em *F8* e a formação de inibidores. Mutações nulas que resultam na ausência ou quase ausência de expressão da proteína, tais como inversão dos *íntrons* 1 e 22, grandes deleções e mutações sem sentido, apresentam maior incidência de inibidores quando comparadas a outros tipos de mutações, tais como mutações de sentido trocado, em sítio de processamento e pequenas deleções, que são consideradas de baixo risco para o desenvolvimento de inibidor (SCHWAAB et al., 1995; FRAKHARZADEH & KAZAZIAN, 2000). Na hemofilia B, o desenvolvimento de inibidor está associado a grandes deleções ou outras graves alterações no gene *F9*. É sugerido que a ausência da proteína resulte em menor tolerância ao tratamento, levando ao aparecimento de uma resposta imunológica (WARRIER & LUSHER, 1998; DIMICHELE, 2002).

Negros e hispânicos possuem, respectivamente, 2,4 e 2,5 vezes mais chances de desenvolverem inibidor quando comparados a caucasianos, o que sugere que a etnia do paciente pode influenciar no aparecimento de anticorpos (GOUW et al., 2007b). Viel e colaboradores (2009), descreveram que, dependendo do haplótipo, seis proteínas (FVIII) diferentes podem ser codificadas (H1, H2, H3, H4, H5 e H6), sendo que três dessas proteínas (H3, H4 e H5) são encontradas apenas na população negra Norte-Americana. O Fator VIII recombinante comumente possui sua sequência de aminoácidos compatível com os haplótipos H1 e H2, presentes em todos os grupos étnicos. Dessa forma, Viel e colaboradores (2009), sugerem que pacientes com haplótipos que codificam proteínas diferentes das encontradas no concentrado de fator recombinante, principalmente H3 e H4, podem desenvolver uma resposta imunológica mais facilmente. Santos e colaboradores (2009), também observaram maior prevalência de inibidor na população negra brasileira (SANTOS et al., 2009).

Alguns estudos revelam que polimorfismos em genes relacionados à resposta imune, tais como o HLA, IL-1 e IL-10, possam estar relacionados ao desenvolvimento de anticorpos (ASTERMARK et al., 2006; SANTOS et al., 2009; CHAVES et al., 2010a). Entretanto, nem todos os autores reproduziram esses achados (BAFUNNO, et al.,

2009). Em 2010, Chaves e colaboradores realizaram a análise de polimorfismos nas citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e TNF- α em pacientes com hemofilia atendidos na Fundação HEMOMINAS, em Belo Horizonte, Minas Gerais. Não foi encontrada associação dos polimorfismos presentes nos genes de IL-4, IL-5 e TNF- α com o desenvolvimento de inibidor. Entretanto, portadores do haplótipo GCC/ACC, presente na IL-10, apresentaram um risco 5,8 vezes maior de desenvolvimento de anticorpos anti-FVIII (CHAVES et al., 2010a).

Assim, o desenvolvimento de inibidores parece ser resultante da predisposição genética do indivíduo e de condições ambientais ou exógenas. O conhecimento dos fatores de risco relacionados ao desenvolvimento dos inibidores é crucial para sua prevenção e o estabelecimento de terapêutica adequada para essa grave complicação da hemofilia.

1.5. Imunologia e hemofilia

As células T são capazes de detectar antígenos através da interação com as moléculas apresentadas pelas células apresentadoras de antígenos (APCs). As APCs, que podem ser macrófagos, células dendríticas, enterócitos, linfócitos B ou células endoteliais (VAZ & FARIA, 1993), digerem parcialmente a proteína, acoplam os peptídeos derivados da mesma às moléculas do complexo maior de histocompatibilidade humano (HLA) e os apresentam aos linfócitos T, que então se tornam ativos.

As citocinas e quimiocinas são moléculas de baixo peso molecular que atuam como mensageiros extracelulares, modulando a resposta imunológica. As quimiocinas são responsáveis pela migração dos leucócitos, contribuindo para a resposta imune adaptativa (CRUVINEL et al., 2010). As citocinas são produzidas por quase todas as células do sistema imunológico natural e adaptativo e influenciam na direção, intensidade e resultado de muitos mecanismos efetores.

As células T auxiliares (Th) podem ser divididas em grupos de acordo com o padrão de citocinas secretadas. As células Th1 são conhecidas pela produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2, que são citocinas pró-inflamatórias e favorecem o desencadeamento de uma

resposta imunológica a partir da ativação de fagócitos e linfócitos, bem como estimulação dos linfócitos B (MURPHY, 1998; MESQUITA et al., 2010; WAN, 2010). As células Th2 estão associadas à resposta humoral e favorecem a produção de anticorpos, proliferação e diferenciação das células B, tendo como mediadoras citocinas anti-inflamatórias/regulatórias, como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (MESQUITA et al., 2010; WAN, 2010).

Tanto os linfócitos T CD4 quanto os T CD8 ativados são importantes na modulação da resposta imune dos inibidores em hemofilia, devido à produção diferencial de citocinas, induzida pela infusão da proteína exógena, no caso, FVIII ou FIX, que não é reconhecida pelo organismo (LOLLAR, 2004; WHITE et al., 2005; CHAVES et al., 2008). Embora o mecanismo exato de desenvolvimento de inibidor em hemofilia congênita ainda não tenha sido elucidado, acredita-se que o FVIII infundido seja endocitado pelas APCs, que clivam a proteína e apresentam seus peptídeos às células T CD4 via HLA de classe II. Em adição, alguns fragmentos também podem ser apresentados às células T CD8 através do HLA de classe I. Essas interações levam à expansão clonal do linfócito T ativo que, ao secretar citocinas, induz a formação de anticorpos inibidores do FVIII pelos linfócitos B (LOLLAR, 2004; CHAVES et al., 2008). Paralelamente, células T reguladoras produzem as citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β e regulam a resposta imune inata e adaptativa, provavelmente pela diminuição da atividade citotóxica das células T CD8 e NK, da perforina e INF- γ (MESQUITA et al., 2010; VITELLI-AVELAR et al., 2005). Acredita-se que esses mecanismos regulatórios possam diminuir a produção de inibidores.

Os monócitos e neutrófilos são leucócitos com capacidade fagocitária e desempenham importante papel nas primeiras fases da reação inflamatória (CRUVINEL et al., 2010). Durante o tratamento com infusão do fator deficiente, alguns pacientes apresentam um perfil de resposta pró-inflamatório mediado por células T, que induz à síntese de anticorpos IgG1 anti-FVIII, sem atividade inibitória (CHAVES et al., 2010b). Após o desenvolvimento de inibidor, parece ocorrer uma alteração desse perfil para um estado anti-inflamatório/regulatório, mediado por neutrófilos e monócitos, com alta expressão de IL-5 e IL-10, e baixos níveis de IL-2, IL-4, IFN- γ e TNF- α , induzindo os linfócitos B a produzirem anticorpos do tipo IgG4 (CHAVES et al., 2010b). No entanto,

ainda não temos conhecimento de estudos que tenham descrito o perfil de ativação celular e citocinas em pacientes com hemofilia antes do início do tratamento com concentrado de fator. Ainda, até o presente momento, nenhum estudo avaliou o perfil de quimiocinas em pacientes hemofílicos.

As micropartículas (MPs) formam uma população heterogênea de pequenos fragmentos (0.1-1.0 μm) liberados da membrana plasmática após ativação celular ou na fase inicial de apoptose (DISTLER et al., 2006). Em 1967, as MPs foram reconhecidas em microscopia eletrônica como pequenas vesículas, denominadas “*platelet dust*”, por serem liberadas de plaquetas ativadas e também apresentarem atividade pró-coagulante, sendo capazes de acelerar a coagulação sanguínea e otimizar a adesão plaquetária (WOLF, 1967; BURNIER et al., 2009).

Essa atividade pró-coagulante pode ser explicada pela presença de fosfolipídios, como a fosfatidilserina e proteínas, como o FT e a P-selectina, no exterior da membrana das MPs, tornando a superfície celular catalítica para o complexo protrombinase e possibilitando a adesão de células como leucócitos, neutrófilos e monócitos (MEZIANI et al., 2008; MAUSE & WEBER, 2010; GUEDDINGS & MACKMAN, 2014).

Apesar de as MPs circulantes serem encontradas em indivíduos saudáveis, diversos estudos vêm relacionando essas vesículas às condições patológicas. Foi observada uma redução nos níveis de MPs derivadas de plaquetas e endotélio em pacientes com hemofilia após a infusão de fator VIII sob demanda (MOBARREZ et al., 2012). Proulle e colaboradores descreveram aumento nos níveis de MPs pró-coagulantes, derivadas principalmente de plaquetas, em pacientes com hemofilia e inibidor, logo após a infusão do fator VII ativo recombinante – rFVIIa (Novoseven®). O mesmo não foi observado em pacientes sem inibidor, tratados com fator VIII (PROULLE et al., 2004). No ano seguinte, Proulle e colaboradores afirmaram que pacientes com hemofilia com menos de 18 anos possuem maiores níveis de MPs quando comparados aos pacientes maiores de 18 anos (PROULLE et al., 2005). No entanto, até a presente data, não existem estudos que tenham descrito o perfil de MPs em pacientes com hemofilia antes do início do tratamento com concentrado de fator.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Determinar o perfil imunológico de pacientes com hemofilia recentemente diagnosticada.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar o perfil fenotípico de leucócitos circulantes em pacientes com hemofilia recém-diagnosticada;
- Analisar a concentração plasmática das citocinas INF- γ , TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 em pacientes com hemofilia recém-diagnosticada e em controles sem hemofilia;
- Analisar a concentração plasmática de quimiocinas IL-8, RANTES, MIG, MCP-1 e IP-10 em pacientes com hemofilia recém-diagnosticada e em controles sem hemofilia;
- Analisar a dosagem das micropartículas CD41, CD3, CD66, CD14, CD45, CD235 e CD51 no plasma de pacientes com hemofilia recém-diagnosticada e em controles sem hemofilia;
- Comparar as concentrações de citocinas e quimiocinas e de micropartículas encontradas nos pacientes com hemofilia recém-diagnosticada com controles sem hemofilia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Desenho do estudo

Este projeto é um subprojeto do estudo multicêntrico de coorte prospectivo intitulado “Avaliação dos fatores clínicos, imunológicos e genéticos relacionados ao desenvolvimento de inibidores em hemofilia”, e tem como objetivo analisar os resultados obtidos a partir das dosagens realizadas no momento da inclusão dos pacientes, comparando-os com controles sem hemofilia saudáveis (Figura 3).

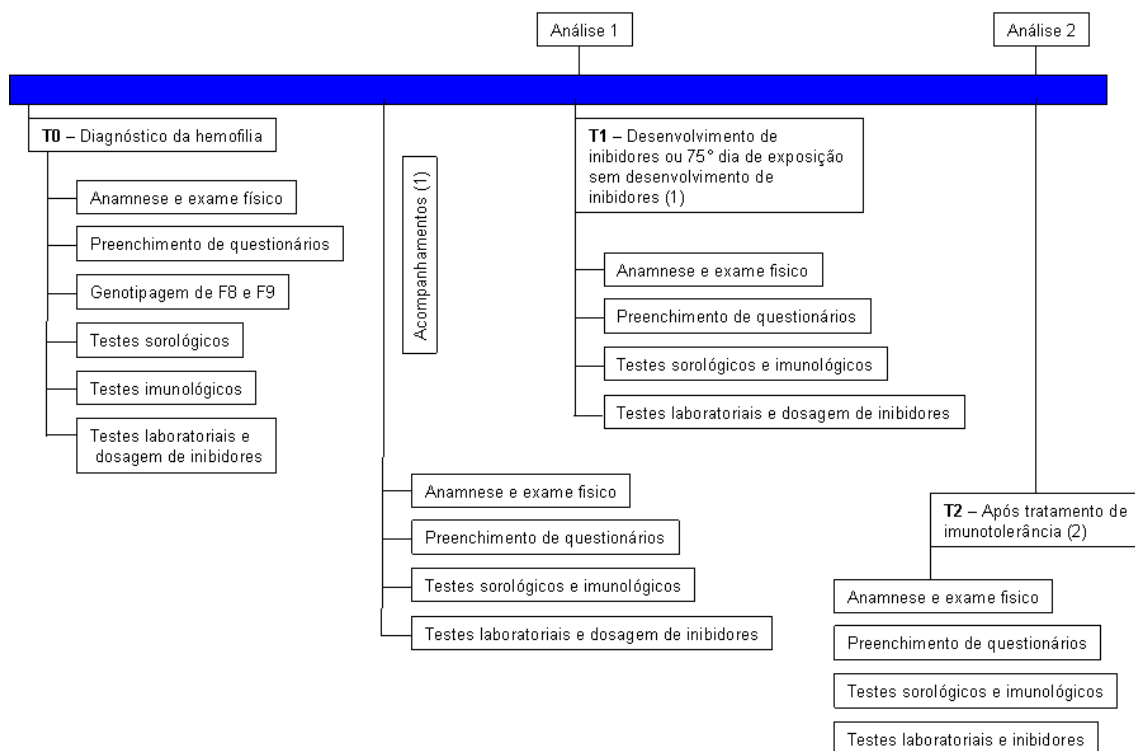


Figura 3. Delineamento do estudo original.

3.2. Locais do estudo

O estudo é uma colaboração entre a Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, a Fundação HEMOMINAS, o Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (Fundação HEMORIO), o Centro de Hemoterapia e Hematologia do Espírito Santo (HEMOES) e o Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR).

Os participantes do estudo foram diagnosticados e acompanhados nos hemocentros do Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Curitiba e Vitória. Nesses locais também foram realizados os exames de rotina dos pacientes incluídos. As dosagens de citocinas, quimiocinas e imunofenotipagem de leucócitos foram realizadas no laboratório do Serviço de Pesquisa da Fundação HEMOMINAS. As dosagens de micropartículas foram realizadas no laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ.

3.3. População do estudo

Os participantes da pesquisa foram atendidos na Fundação HEMOMINAS, Hemocentro do Paraná (HEMEPAR), Hemocentro do Espírito Santo (HEMOES) e Hemocentro do Rio de Janeiro (HEMORIO). Os pacientes foram incluídos consecutivamente após confirmação do diagnóstico de hemofilia A ou B, sempre que possível antes da primeira infusão de qualquer hemocomponente/hemoderivado.

Após inclusão, os pacientes foram encaminhados para a primeira avaliação clínica, quando foram realizados anamnese e exame físico, além da coleta de dados sócio-demográficos, clínicos e laboratoriais através do preenchimento de formulários padronizados. Também foi entregue ao participante do estudo uma cartilha de acompanhamento, que foi preenchida pelo familiar responsável no período de intervalo entre as consultas.

A partir do diagnóstico, os pacientes continuam sendo acompanhados através de uma avaliação clínica periódica, com intervalos de no máximo 60 dias, realizada nos centros participantes. Essas avaliações incluem a realização de anamnese e exame físico, assim como preenchimento dos formulários de acompanhamento.

Todo participante possui um código de identificação, que acompanha a amostra e todos os formulários referentes a ele durante o estudo. O número de identificação do

participante é composto pela sigla do Estado acrescido de uma barra (/) seguida por um número sequencial (de até três dígitos) do participante de acordo com a sequência da sua inclusão (Figura 4). As instruções para coleta, registro e transporte de amostras estão disponíveis no formulário 8 e no Manual de Coleta e Transporte de Amostras.

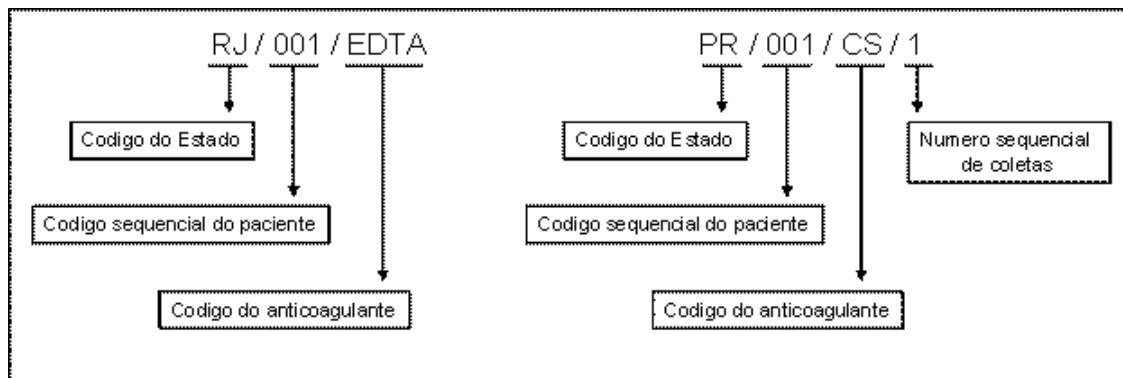


Figura 4. Orientação para identificação de amostras

O grupo controle é composto por indivíduos do sexo masculino, saudáveis, brasileiros, na mesma faixa etária que os pacientes incluídos no projeto (*Interquartile range* [IQR] 7,7-16,7 meses), todos coletados no Ambulatório de pediatria do Hospital das Clínicas de Minas Gerais / UFMG. Os participantes do grupo-controle são eutróficos, com exame clínico sem alterações, normotensos, com peso, estatura e índice de massa corporal (IMC) dentro dos limites da normalidade, função renal normal e sem passado mórbido digno de nota.

3.4. Considerações éticas do estudo

O estudo foi aprovado pelos comitês de ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, Fundação HEMOMINAS, Fundação HEMORIO, Fundação HEMEPAR e Fundação HEMOES. Todos os responsáveis pelos pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

3.5. Coleta de amostras

No momento do diagnóstico (T0) foram coletados dois tubos de sangue periférico, contendo citrato de sódio 3,2%, para determinação da atividade coagulante dos fatores VIII e IX e análise do perfil imunológico (Tabela 1).

As amostras foram coletadas, sempre que possível, antes da primeira infusão de concentrado de fator VIII ou IX, e, necessariamente, antes de 5 dias de exposição ao tratamento. Fatores que podem influenciar os níveis de citocinas, quimiocinas e micropartículas tais como, alergias, vacinação, infecções e inflamações, bem como medicamentos utilizados para o tratamento e qualquer condição correlata, foram identificados através de formulários padronizados.

Tabela 1. Coleta de amostra biológica

Fase do estudo	Tipo de anticoagulante	Exame realizado
T0	Citrato de Sódio 3,2%	Determinação da atividade coagulante dos fatores VIII e IX
T0	Citrato de sódio 3,2%	Imunofenotipagem / Dosagem de micropartículas / CBA para dosagem de citocinas e quimiocinas

T0, momento da inclusão do paciente no estudo; CBA, *Cytometric Bead Array*.

3.6. Testes laboratoriais

3.6.1. Determinação da atividade coagulante dos fatores VIII e IX

Esses testes são rotineiramente realizados nos laboratórios de coagulação dos centros de hemofilia (HEMOMINAS, HEMORIO, HEMEPAR e HEMOES) ao diagnóstico do paciente, para definição do tipo de hemofilia (A ou B) e classificação da gravidade.

Para garantir que a dosagem de FVIII:C e FIX:C seja referente ao fator endógeno, é importante que haja um período mínimo de 15 a 30 dias entre a coleta das amostras destinadas a essa análise de FVIII:C e FIX:C, respectivamente, e a última infusão de concentrado de fator, o que nem sempre é possível garantir. É altamente desejável que esta dosagem seja realizada ao diagnóstico do paciente, isto é, anterior à infusão de quaisquer produtos contendo fator VIII ou IX.

Para tal, 5-10 mL de sangue venoso foram coletados em citrato de sódio 3.2%. O sangue total foi centrifugado a 3.500 rpm por 15 minutos a 4°C. O plasma separado foi armazenado em tubos de polipropileno (tipo *ependorf*) em alíquotas de 500 µL e congelado imediatamente a -80°C.

Para a determinação da atividade coagulante dos FVIII e FIX dilui-se o plasma de cada paciente na proporção de 1:5 com Tampão Imidazol (0,1 mL de plasma + 0,4 mL de tampão). Ao volume de 0,1 mL desta diluição foram adicionados 0,1 mL de plasma deficiente (em fator VIII ou IX, conforme a atividade a ser testada) e 0,1 mL de cefalina. Essa mistura foi incubada a 37°C por 3 minutos, sendo então adicionado 0,1 mL de cloreto de cálcio 0,025 M e registrado o tempo de formação do coágulo. O resultado foi fornecido em tempo e calculado em atividade (%) a partir de uma curva de calibração realizada com amostras normais (*pool* de plasma de controles normais). Os testes foram realizados em duplicata, sendo o resultado final a média entre as duas dosagens.

3.6.2. Análise do perfil imunológico

Neste estudo, analisamos as concentrações de micropartículas, citocinas e quimiocinas totais no plasma dos pacientes recém-diagnosticados em hemofilia e em controles. Nos pacientes provenientes da Fundação HEMOMINAS e HEMOES, também foi realizada a imunofenotipagem de leucócitos do sangue periférico.

A dosagem de MPs, CBA e imnofenotipagem foi realizada apenas uma vez.

3.6.2.1. Análise fenotípica de leucócitos do sangue periférico

Para realização da imunofenotipagem foram coletados aproximadamente 4 mL de sangue total de veia periférica, contendo citrato de sódio a 0,124 M como anticoagulante.

O volume de 1 μ L de cada anticorpo foi adicionado a nove tubos de 5 mL de poliestireno, de acordo com as especificações na Tabela 2 (Apêndice A – Tabela suplementar 1). Foram adicionados 50 μ L de sangue total a cada um dos tubos e a mistura foi então incubada por 30 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Ao final do período de incubação, foram adicionados 2 mL de solução de lise eritrocitária 1 X (10 mM Tris-HCl, 11% sacarose, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, pH 8,0) sob agitação e os tubos incubados a temperatura ambiente por 10 minutos ao abrigo da luz. Centrifugou-se os tubos a 1.300 rpm por 7 minutos a 18°C e o sobrenadante foi descartado por inversão. Foi adicionado 1 mL de PBS-W (tampão fosfato suplementado com 0,5% de soro-albumina bovina e 0,1% de azida sódica) e novamente os tubos foram centrifugados a 1.300 rpm por 7 minutos a 18°C, sendo o sobrenadante descartado por inversão. O processo de lavagem foi repetido com 2 mL de PBS-W. Após desprezar o sobrenadante, os tubos foram agitados, as células ressuspendidas em 300 μ L de solução fixadora MaxFacsFix (MFF) (10,0 g/L de paraformaldeído, 10,2 g/L de cacodilato de sódio e 6,65 g/L de cloreto de sódio, pH 7,2) e incubadas a 4°C por 10 minutos. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, San Jose, Estados Unidos).

Os pacientes foram avaliados de acordo com a expressão de moléculas de superfície com a finalidade de se determinar o fenótipo presente (Tabela 3).

Tabela 2. Marcadores e fluorescências utilizados na realização da imunofenotipagem por paciente.

Tubos	Marcadores / Canal de leitura			
	FL1	FL2	FL3	FL4
1	CD4	HLA-DR	CD8	-
2	CD3	CD56	CD16	-
3	CD5	HLA-DR	CD19	-
4	CD16	HLA-DR	CD14	-
5	CD32	-	CD14	CD19
6	CD19	CD27	-	CD20
7	-	CD80	CD86	CD19
8	CD64	-	CD14	-
9	CD4	CD25	-	-

FITC, *Fluorescein isothiocyanate*; PE, *Phycoerythrin*; TC, *TriColour*; APC, *Allophycocyanin*; FL, canal de fluorescência; CD, *cluster of differentiation*.

Tabela 3. Marcadores para avaliação de leucócitos

Marcador	Fenótipo alvo
CD4 ⁺ HLA-DR ⁺	Linfócito T CD4
CD8 ⁺ HLA-DR ⁺	Linfócito T CD8
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁻	Células pré-NK
CD3 ⁺ CD16 ⁺	Células NK
CD5 ⁺ CD19 ⁺	Linfócitos B1
CD19 ⁺ HLA-DR ⁺	Linfócitos B ativos
CD14 ⁺ HLA-DR ⁺	Monócitos
CD16 ⁺ HLA-DR ⁺	Neutrófilos
CD19 ⁺ CD32 ⁺	Modulador negativo de IgG
CD19 ⁺ CD20 ⁺	Linfócitos B maduros
CD19 ⁺ CD27 ⁺	Linfócitos B de memória
CD19 ⁺ CD80 ⁺	Linfócitos B ativados com alta expressão de CD80
CD19 ⁺ CD86 ⁺	Linfócitos B ativados com alta expressão de CD86
CD14 ⁺ CD64 ⁺	Monócitos ativados com alta expressão de CD64
CD14 ⁺ CD32 ⁺	Monócitos senescentes
CD4 ⁺ CD25 ⁺	Linfócitos T reguladores

Os marcadores CD3, CD16 e CD56 foram avaliados dentro do *gate* de linfócitos; CD5, CD19, CD20, CD27, CD80 e CD86 foram avaliados a partir da população de linfócitos B. NK, *Natural Killer*; IgG, *Imunoglobulina G*. HLA-DR, *Human leukocyte antigen*; CD, *cluster of differentiation*.

3.6.2.2. Análise de micropartículas

Para dosagem de MPs, o plasma foi centrifugado por 5 minutos, em temperatura ambiente, a 13.000 x g. Um volume de 100 µl do sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 300 µl da solução de citrato de sódio (0,124 M) (BD, Franklin Lakes, USA) e heparina (5.000 unidades) (Roche, Rio de Janeiro, Brasil), na proporção 1:3. A mistura foi centrifugada a 1.500 x g por 90 minutos a 15°C e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. O *pellet* foi ressuspenso em 100 µl tampão de anexina (BD Pharmingen, San Jose, Estados Unidos) e então transferido para uma placa contendo 2,5 µl de FITC Anexina V (BD Pharmingen, San Jose, Estados Unidos) em todos os poços e 4 µl de cada um dos anticorpos (descritos na Tabela 4). A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após a incubação, 300 µl de tampão de anexina (BD Pharmingen, San Jose, USA) foram adicionados na concentração 1 X e a solução foi transferida para os tubos de análise. A leitura foi realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, Estados Unidos).

Para determinação das MPs/µL foi utilizado o seguinte cálculo:

$$\text{MPs}/\mu\text{L} = (\text{N} \times 400) / (60 \times 100)$$

Onde N é o número de eventos adquiridos na região das MPs, 400 é o volume total em cada tubo antes da fenotipagem, 60 é o volume de amostras analisadas durante a fenotipagem e 100 é o volume original da suspensão de MPs.

Tabela 4. Anticorpos utilizados para dosagem de micropartículas

Célula alvo	Anticorpo	Fluorocromo
Linfócitos	Anti-CD3	PE
Plaquetas	Anti-CD41a	Cy 5.5
Eritrócitos	Anti-CD235a	PECy5
Neutrófilos	Anti-CD66	PE
Endotélio	Anti-CD51	PE
Leucócitos	Anti-CD45	APC
Monócitos	Anti-CD14	PerCP

PE, *Phycoerythrin*; APC, *Allophycocyanin*, PerCP, *Peridininchlorophyll protein*; PECy5, *Phycoerythrin-Cyanin 5.1*; Cy 5.5, *Peridinin-chlorophyllprotein 5.5*; CD, *cluster of differentiation*.

3.6.2.3. Dosagem de citocinas e quimiocinas plasmáticas

Após a coleta de sangue periférico (5 mL) em tubo contendo Citrato de Sódio, as amostras foram centrifugadas e o plasma utilizado para dosagem de citocinas utilizando-se o *kit* comercial (*CBA [Cytometric Bead Array]*; BD Pharmigen, San Jose, Estados Unidos), de acordo com especificações do fabricante. Esse método se baseia na captura de um analito solúvel por *beads* de tamanho e fluorescência conhecidos. O *kit* é constituído por *beads* (cada tipo conjugado com um anticorpo específico) e pelo reagente de detecção que é composto por uma mistura de *ficoeritrina* (PE) conjugada com anticorpos. Ao serem incubadas com o plasma do paciente, as citocinas e quimiocinas específicas se ligam às *beads* formando um complexo *bead* + analito + reagente de detecção, que é dosado através de citometria de fluxo. A concentração da partícula é medida a partir da intensidade da fluorescência gerada, comparando-se a uma curva padrão.

Foram quantificadas as citocinas INF- γ , TNF, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-17 e as quimiocinas IL-8, RANTES, MIG, MCP-1 e IP-10. Por se tratar de dosagens de partículas certamente presentes no organismo do paciente, seja em maior ou em menor concentração, o teste não apresenta resultados falso-positivos nem falso-negativos.

3.7. Plano de coleta e análise dos dados

Para a coleta de dados sócio-demográficos e clínicos da linha de base foi utilizado o questionário do Estudo Rodin, gentilmente cedido pela investigadora principal, Dra. Marijke van den Berg, da Universidade de Utrecht, Holanda. Os formulários foram integralmente traduzidos para a língua portuguesa. Alguns dados de interesse do nosso grupo foram adicionados.

Os resultados das dosagens imunológicas obtidos foram inseridos nas planilhas e os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do software GraphPad Prism 5 (Prism Software, Irvine, Estados Unidos). Para comparação dos grupos não pareados, foi utilizado o teste Mann Whitney. O nível de significância foi estabelecido para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Pacientes

No período de janeiro de 2013 a março de 2015, foram incluídos 33 pacientes no estudo, sendo 16 (48,5%) pacientes diagnosticados em Minas Gerais, 4 (12,1%) no Espírito Santo, 4 (12,1%) no Paraná e 9 (27,3%) no Rio de Janeiro. Um paciente (MG/007) faleceu. A criança sofreu trauma encefálico devido a uma queda, que evoluiu pra quadro de depressão cerebral, coma e rápida progressão ao óbito. O falecimento ocorreu após a coleta da amostra biológica e do preenchimento dos formulários de inclusão, permitindo a manutenção do paciente no estudo.

Um paciente incluído na Fundação HEMOMINAS mudou-se para o Espírito Santo e passou a ser acompanhado na Fundação HEMOES. Um paciente incluído do HEMORIO (RJ/003) mudou-se para o interior da Paraíba antes que as amostras de sangue fossem coletadas e os formulários preenchidos e, por isso, não pôde mais ser acompanhado, sendo excluído do projeto. Assim, 32 pacientes participaram do estudo.

4.2. Características da população estudada

Todos os pacientes incluídos no estudo são do sexo masculino, com mediana de idade no momento da inclusão de 8 meses (Mediana, 8 meses; *IQR*, 2,75-11,25 meses). Todos os pacientes possuem nacionalidade brasileira (Tabela suplementar 2 – Apêndice B).

Com relação ao tipo e gravidade da doença, 25 pacientes (78,2%) têm hemofilia A grave, dois pacientes (6,3%) têm hemofilia A moderada, um (3,1%) tem hemofilia A leve, dois (6,3%) têm hemofilia B grave, um (3,1%) tem hemofilia B moderada e um (3,1%) tem hemofilia B leve (Tabela 5).

Os pacientes que já haviam recebido alguma dose de concentrado de fator não foram excluídos do estudo. No momento da inclusão, dois pacientes (6,3%) tiveram um dia de exposição, três pacientes (9,3%) dois dias de exposição, um paciente (3,1%) teve três dias de exposição, quatro pacientes (12,5%) tiveram quatro dias de exposição e 22 pacientes (68,8%) não haviam recebido nenhuma dose do concentrado de fator. A

mediana de dias de exposição na data da inclusão no projeto é de zero dias (*IQR*, 0-3 dias; mínimo, zero e máximo, 4 dias).

Dentre os 10 pacientes que receberam fator antes da inclusão no projeto, dois (20%), ambos com apenas 1 dia de exposição, receberam concentrado de fator VIII do tipo plasmático. Um paciente (10%) com 4 dias de exposição recebeu fator IX plasmático. Os outros sete pacientes (70%) receberam fator VIII de origem recombinante.

Dos 32 pacientes incluídos, 27 (84,4%) apresentaram sangramentos antes do diagnóstico de hemofilia ser confirmado, sendo desses, um (3,7%) sangramento gengival, dois (7,4%) apresentaram sangramento em local da punção após coleta de exames rotineiros, um (3,7%) apresentou cefalohematoma após parto normal com auxílio de fórceps, um paciente (3,7%) desenvolveu hemartrose no joelho esquerdo e os outros 22 pacientes (81,5%) apresentavam hematomas pelo corpo. Os cinco pacientes (15,6%) diagnosticados antes do aparecimento de qualquer sintoma procuraram o centro devido a histórico familiar (Tabela 5).

Tabela 5. Características da população estudada.

Características	Pacientes (n=32)	Controles (n=47)
Idade	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)
	8 meses (2,8-11,3)	12.2 meses (7,7-16,7)
Cor	n (%)	n (%)
Branco	21 (65,6)	16 (34)
Negro	5 (15,6)	9 (19)
Pardo	4 (12,5)	-
Índio	2 (6,3)	-
Indefinido	-	22 (47)
Tipo de Hemofilia	n (%)	n (%)
A	28 (87,5)	NA
B	4 (12,5)	NA
Gravidade	n (%)	n (%)
Grave	27 (84,4)	NA
Moderada	3 (9,4)	NA
Leve	2 (6,2)	NA
Motivo do diagnóstico	n (%)	n (%)
Sangramento	27 (84,4)	NA
Histórico familiar	5 (15,6)	NA
DE antes da inclusão	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)
	0 (0-3)	NA
Fator antes da inclusão*	n (%)	n (%)
Fator VIII Plasmático	2 (20)	NA
Fator VIII Recombinante	7 (70)	NA
Fator IX Plasmático	1 (10)	NA

IQR, *Interquartile range*; n, número de pacientes; DE, Dias de exposição; NA, não se aplica.

*Tipo de fator recebido antes da inclusão no projeto

4.3. Perfil imunológico

4.3.1. Perfil fenotípico leucocitário

Dos pacientes incluídos, 19 (59,4%), com hemofilia A e B, foram analisados quanto aos marcadores de ativação de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) e B, células NK, monócitos e neutrófilos, no momento T0 do estudo (Figura 5).

Foram realizadas análises fenotípicas dos leucócitos considerando 16 marcadores celulares dos pacientes com hemofilias A e B. Foram calculadas a média, mediana e o 1º e 3º quartis (Tabela suplementar 3 – Apêndice C).

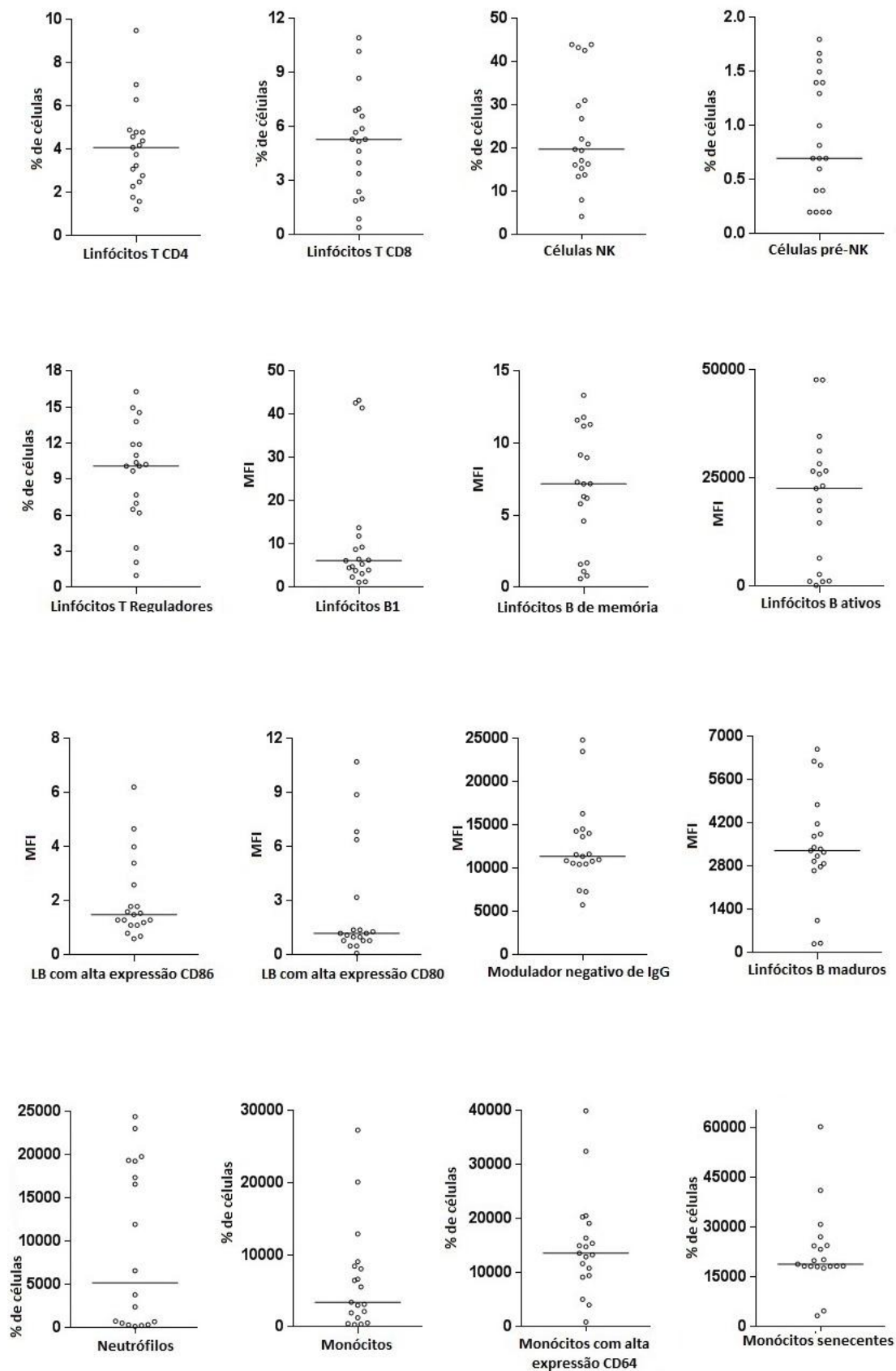


Figura 5. Perfil fenotípico leucocitário.

Perfil observado nos pacientes de acordo com os marcadores de ativação celular. A linha contínua representa a mediana de cada resultado. MFI, intensidade média de fluorescência; CD, *cluster of differentiation*; LB, Linfócitos B.

4.3.2. Dosagem de micropartículas

Foram dosadas MPs de leucócitos, plaquetas, eritrócitos, linfócitos, neutrófilos, monócitos e endotélio de 28 pacientes (87,5%) com hemofilia A no momento da inclusão (PHA) e em 47 controles.

Quando comparados aos controles, o grupo PHA apresentou maiores níveis de MPs de linfócitos T ($p = 0,04$), plaquetas ($p < 0,01$), neutrófilos ($p < 0,01$), leucócitos ($p = 0,036$), monócitos ($p = 0,047$) e eritrócitos ($p < 0,01$). Não foi encontrada diferença na dosagem de MPs de endotélio.

Outra análise foi realizada dividindo-se o grupo PHA em ODE ($n = 19$), formado por pacientes que foram incluídos sem tomar nenhuma dose de concentrado de fator no momento da inclusão, e >1DE ($n = 9$), formado por pacientes que, no momento da inclusão, já tinham 1 ou mais dias de exposição ao fator.

O grupo ODE apresentou maiores níveis de MPs/ μL de linfócitos T ($p < 0,025$), plaquetas ($p < 0,01$), neutrófilos ($p = 0,011$), leucócitos ($p < 0,023$), monócitos ($p = 0,038$) e eritrócitos ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo controle, no entanto, não houve diferença nos níveis de nenhuma das MPs analisadas entre os grupos >1DE e controle (Tabela 6 e Figura 6).

Por fim, realizamos uma análise comparando pacientes que apresentaram sintomas de sangramentos no momento do diagnóstico ($n = 27$) com pacientes diagnosticados em hemofilia por histórico familiar ($n = 5$), sem sintoma clínico aparente. Não foram observadas diferenças nos níveis de MPs entre os dois grupos.

Tabela 6. Dosagem de micropartículas* em pacientes e controles

MPs	PHA Mediana (IQR) n	ODE Mediana (IQR) n	>1DE Mediana (IQR) n	Controle Mediana (IQR) n	Valor de p
Linfócito (CD3)	5,5 (2,8-8,2) n=28	6,2 (3,6-8,2) n=19	3,0 (2,4-8,5) n=9	3,8 (2,8-8,2) n=46	0,04 ^a 0,0247 ^b 0,5193 ^c 0,04031 ^d
Plaquetas (CD41)	11,63 (5,2-62,4) n=28	27,8 (5,5-63,2) n=19	7,7 (3,7-38,6) n=9	5,4 (2,4-5,4) n=47	0,0039 ^a 0,0012 ^b 0,4252 ^c 0,1989 ^d
Neutrófilos (CD66)	3,9 (3,4-7,4) n=28	4,6 (3,4-7,7) n=19	3,8 (3,1-10) n=9	3,1 (0,8-4,9) n=47	0,0061 ^a 0,0112 ^b 0,1182 ^c 0,9134 ^d
Leucócitos (CD45)	8,0 (4,8-13) n=27	10,24 (5,2-16) n=18	6,2 (4,5-9) n=9	5,1 (0-13,7) n=46	0,0359 ^a 0,0227 ^b 0,4822 ^c 0,1277 ^d
Monócitos (CD14)	4,8 (3,3-7,5) n=28	5,1 (3,7-8,2) n=19	4,6 (3,1-5,9) n=9	3,4 (1,2-7,7) n=47	0,0472 ^a 0,0382 ^b 0,4446 ^c 0,5874 ^d
Eritrócitos (CD235)	13,6 (7,5-19,4) n=25	15,6 (7,6-21,4) n=18	10,93 (6,8-13,8) n=7	7,8 (7,5-19,4) n=47	0,005 ^a 0,0052 ^b 0,2341 ^c 0,1735 ^d
Endotélio (CD51)	4,1 (3,3-8) n=27	4,3 (3,3-8) n=19	4,1 (3,4-8,3) n=8	4,5 (2-7,6) n=47	0,4426 ^a 0,5248 ^b 0,5855 ^c 0,9275 ^d

a, PAH x Controles; b, ODE x Controles; c, >1DE x Controles; d, ODE x >1DE.

*em MPs/ μ L. IQR, *interquartile range*; CD, *cluster of differentiation*; ODE, pacientes com zero dias de exposição ao concentrado de fator VIII; >1DE, pacientes com mais de um dia de exposição ao concentrado de fator VIII; PHA, pacientes com hemofilia A.

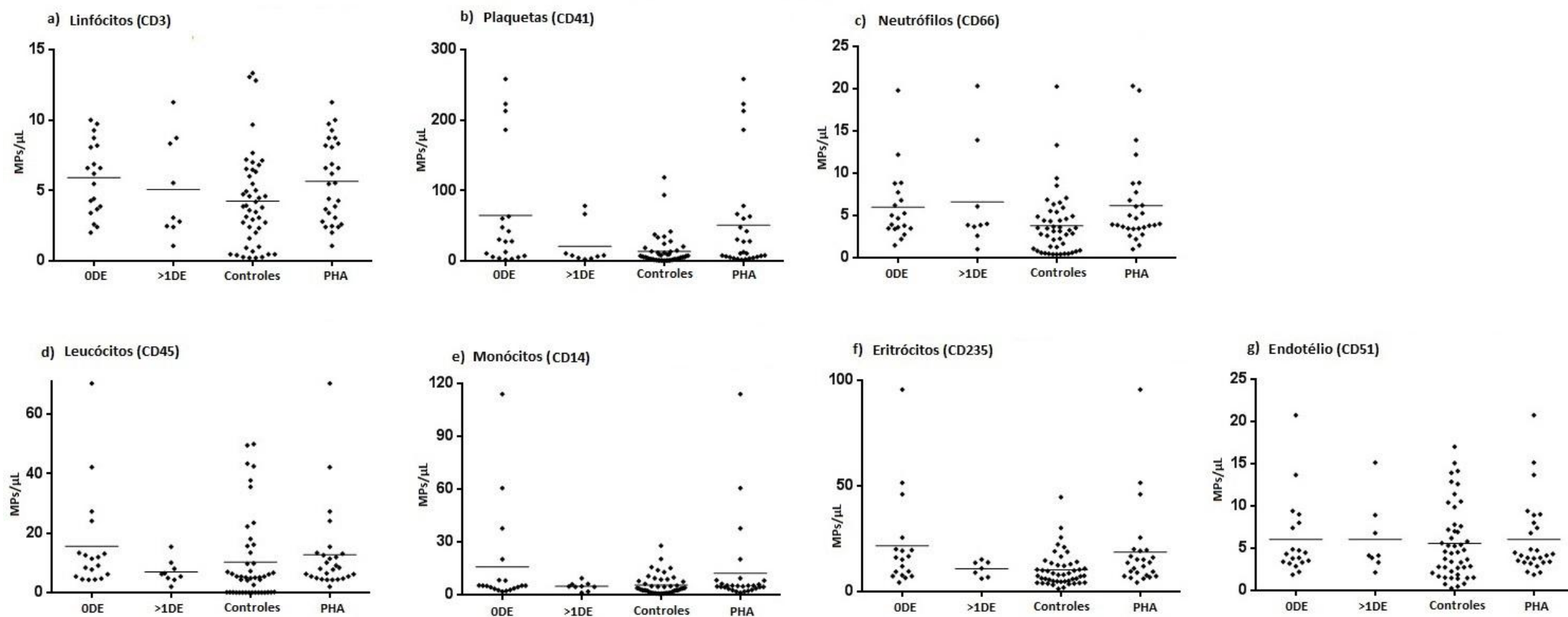


Figura 6. Distribuição das micropartículas* por grupo analisado.

*em MPs/μL. A linha contínua representa a mediana de cada resultado.

CD, *cluster of differentiation*; ODE, pacientes com zero dias de exposição ao concentrado de fator VIII; >1DE, pacientes com mais de um dia de exposição ao concentrado de fator VIII; PHA, pacientes com hemofilia A.

4.3.3. Dosagem de citocinas

Foram dosadas as citocinas de 28 pacientes (87,5%) com hemofilia A (PHA) no momento da inclusão e em 47 controles.

PHA apresentaram maiores níveis de TNF ($p = 0,032$), IL-10 ($p < 0,01$), IL-6 ($p < 0,01$), IL-4 ($p < 0,01$) e IL-2 ($p = 0,03$) quando comparados aos controles.

Outra análise foi realizada separando-se o grupo PHA em ODE ($n = 19$), formado por pacientes que foram incluídos sem tomar nenhuma dose de fator concentrado, e >1DE ($n = 9$), formado por pacientes que, no momento da inclusão, já tinham 1 ou mais dias de exposição ao fator.

Com relação ao grupo ODE, observamos um aumento em IL-10 ($p < 0,01$), IL-6 ($p < 0,01$) e IL-4 ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo controle.

O grupo >1DE apresentou níveis elevados de IL-10 ($p < 0,01$), IL-6 ($p < 0,01$), IL-4 ($p < 0,01$), IL-2 ($p < 0,05$), IFN- γ ($p < 0,01$) e TNF ($p < 0,04$) do que o grupo controle (Tabela 7 e Figura 7).

Observamos diferença entre os grupos ODE e >1DE apenas na dosagem de IFN ($p < 0,01$), onde o grupo >1DE apresentou maiores níveis da citocina.

Tabela 7. Dosagens de citocinas em pacientes e controles

Citocinas	PHA Mediana (IQR)	ODE Mediana (IQR)	>1DE Mediana (IQR)	Controle Mediana (IQR)	Valor de p
TNF	5,5 (0-13,3) n=27	5,1 (0-9,8) n=19	13,6 (0-461,3) n=8	0 (0-7,7) n=46	0,0327 ^a
					0,1288 ^b
					0,0365 ^c
					0,2086 ^d
IFN- γ	0 (0-23,8) n=28	0 (0) n=19	25,8 (0-53,5) n=9	0 (0-23,8) n=46	0,3911 ^a
					0,5734 ^b
					0,0088 ^c
					0,0089 ^d
IL-17	0 (0-39,0) n=28	0 (0-30,8) n=19	0 (0-81,7) n=9	0 (0) n=46	0,0615 ^a
					0,1461 ^b
					0,0607 ^c
					0,2791 ^d
IL-10	5,3 (1,9-10,8) n=27	4,3 7 (1,5-11,7) n=19	6,9 (5,3-9,1) n=8	0 (0-4,9) n=45	0,0009 ^a
					0,0055 ^b
					0,0069 ^c
					0,3935 ^d
IL-6	17,3 (6,2-92,4) n=28	12,2 (5,6-89-7) n=19	23,4 (12,2-10992) n=9	5,1 (0-12,9) n=46	0,0003 ^a
					0,0053 ^b
					0,0025 ^c
					0,2900 ^d
IL-4	3,0 (1,2-6,1) n=28	2,8 (0-6,1) n=19	3,7 (1,5-10,4) n=9	0 (0-3,1) n=45	0,0004 ^a
					0,0090 ^b
					0,0007 ^c
					0,4737 ^d
IL-2	0,6 (0-7,6) n=28	0 (0-6,2) n=19	1,2 (0-15,9) n=9	0 (0-2,6) n=47	0,0324 ^a
					0,1165 ^b
					0,0497 ^c
					0,3711 ^d

a, PHA x Controles; b, ODE x Controles; c, >1DE x Controles; d, ODE x >1DE

IL, interleucina; IQR, *interquartile range*; ODE, pacientes com zero dias de exposição ao concentrado de fator VIII; >1DE, pacientes com mais de um dia de exposição ao concentrado de fator VIII; PHA, pacientes com hemofilia A.

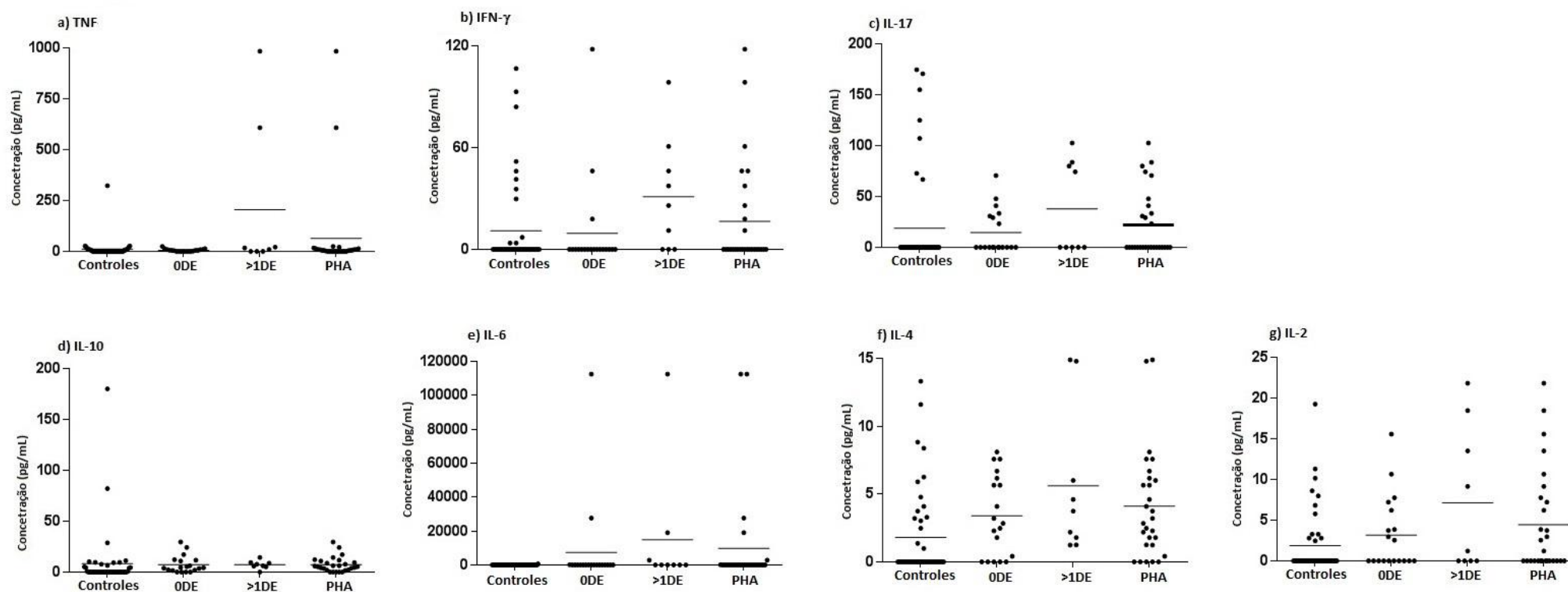


Figura 7. Distribuição de citocinas por grupo analisado.

A linha contínua representa a mediana de cada resultado.

CD, *cluster of differentiation*; ODE, pacientes com zero dias de exposição ao concentrado de fator VIII; >1DE, pacientes com mais de um dia de exposição ao concentrado de fator VIII; PHA, pacientes com hemofilia A.

4.3.4. Dosagem de quimiocinas

Foram dosadas as quimiocinas de 28 pacientes (87,5%) com hemofilia A (PHA) no momento da inclusão e em 47 controles.

Ao serem comparados aos controles, PHA apresentaram maiores níveis de IL-8 ($p < 0,01$) e menores níveis de MIG ($p < 0,01$).

Outra análise foi realizada separando-se o grupo PHA em 0DE ($n = 19$), formado por pacientes que foram incluídos sem receber nenhuma dose de fator concentrado, e >1DE ($n = 9$), formado por pacientes que, no momento da inclusão, já tinham 1 ou mais dias de exposição ao fator.

Observamos um aumento nos níveis de IL-8 tanto no grupo 0DE ($p < 0,01$) quanto no grupo >1DE ($p < 0,01$) quando comparados aos controles. Observamos também, uma redução nos níveis de MIG ($p < 0,01$) do grupo 0DE quando comparado ao controle e, o mesmo no grupo >1DE ($p = 0,04$) (Tabela 8 e Figura 8).

Tabela 8. Dosagem de quimiocinas em pacientes e controles

Quimiocinas	PHA Mediana (IQR)	ODE Mediana (IQR)	>1DE Mediana (IQR)	Controle Mediana (IQR)	Valor de p
IL-8	270,8	168,9	491,8	66,8	<0,0001 ^a
	(89,9-1140)	(83,3-907,7)	(138,4-73167)	(35,1-105,4)	0,0001 ^b
	n=28	n=19	n=9	n=45	<0,0001 ^c
					0,1714 ^d
RANTES	18262	31131	14096	24519	0,8973 ^a
	(8975-78602)	(8521-110692)	(8781-31590)	(7673-57192)	0,4460 ^b
	n=28	n=19	n=9	n=44	0,355 ^c
					0,2553 ^d
IP-10	4009	4052	3824	3646	0,1036 ^a
	(3174-60451)	(3339-5879)	(2496-6334)	(2836-4615)	0,0883 ^b
	n=28	n=19	n=9	n=45	0,5370 ^c
					0,8245 ^d
MCP-1	712,8	747,9	667,7	563,8	0,7244 ^a
	(362,6-1069)	(297,5-1323)	(521,9-882,1)	(433,6-892,5)	0,8246 ^b
	n=26	n=19	n=7	n=45	0,7109 ^c
					0,6659 ^d
MIG	0	0	0	2736	0,0003 ^a
	(0)	(0)	(0)	(0-159173)	0,0016 ^b
	n=26	n=17	n=9	n=45	0,0396 ^c
					0,7646 ^d

a, PHA x Controles; b, ODE x Controles; c, >1DE x Controles; d, ODE x >1DE

IL, interleucina; IQR, *interquartile range*; ODE, pacientes com zero dias de exposição ao concentrado de fator VIII; >1DE, pacientes com mais de um dia de exposição ao concentrado de fator VIII; PHA, pacientes com hemofilia A.

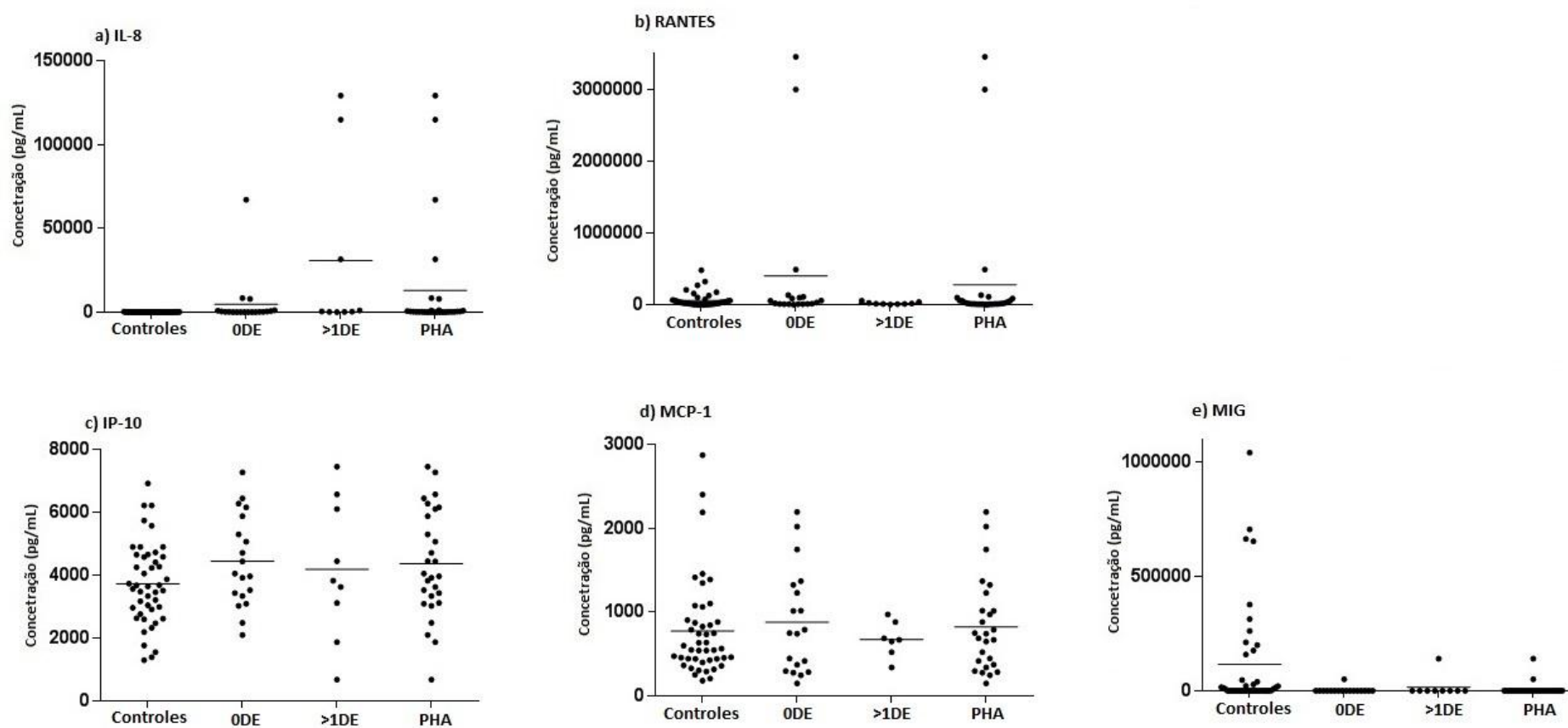


Figura 8. Distribuição de quimiocinas por grupo analisado.

A linha contínua representa a mediana de cada resultado.

CD, *cluster of differentiation*; ODE, pacientes com zero dias de exposição ao concentrado de fator VIII; >1DE, pacientes com mais de um dia de exposição ao concentrado de fator VIII; PHA, pacientes com hemofilia A.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O presente estudo teve como objetivo principal determinar o perfil imunológico de pacientes com hemofilia recentemente diagnosticada, através da análise da concentração plasmática de citocinas, quimiocinas, micropartículas e da imunofenotipagem de leucócitos. Em comparação com controles saudáveis, pacientes com hemofilia A apresentaram aumento de MPs derivadas de plaquetas, leucócitos, monócitos, neutrófilos, eritrócitos e linfócitos T; altos níveis das citocinas TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2, nível elevado da quimiocina IL-8 e reduzido de MIG. Estes resultados sugerem que, mesmo em pacientes previamente não tratados com concentrado de fator VIII, o perfil imunológico dos pacientes com hemofilia A se difere de controles saudáveis, provavelmente, estimulado por microhemorragias ou sangramentos subclínicos.

Poucos foram os estudos que avaliaram os níveis de MPs no plasma de pacientes com hemofilia (PROULLE et al., 2004, 2005; MOBARREZ et al., 2012). Mobarrez e colaboradores mostraram que pacientes com hemofilia sem inibidor apresentaram redução nos níveis de MPs derivadas de plaquetas e de endotélio após a infusão do concentrado de fator (MOBARREZ et al., 2012). Já os pacientes com inibidor apresentaram níveis aumentados de MPs pró-coagulantes, derivadas principalmente de plaquetas, logo após a infusão de concentrado de fator VII ativado recombinante (PROULLE et al., 2004). O mesmo grupo encontrou grande heterogeneidade de MPs em controles sem hemofilia e em pacientes com hemofilia sem sangramento agudo (PROULLE et al., 2005). Em nosso estudo, encontramos um aumento das MPs derivadas de plaquetas, leucócitos, monócitos, neutrófilos, eritrócitos e linfócitos T nos pacientes com hemofilia quando comparados aos controles. Embora a coleta de sangue tenha sido cuidadosamente realizada longe dos episódios de sangramento, infecções, inflamação ou vacinas, é possível que o aumento de MPs, nos pacientes com hemofilia previamente não tratados, resulte da ativação da coagulação após os sangramentos, ainda que subclínicos ou de pequena gravidade. Ao analisarmos as características clínicas dos pacientes incluídos, percebemos que o tipo da hemorragia no momento da inclusão variou de pequenos sangramentos na maioria dos pacientes (n = 27) até hemartrose em um paciente. Cinco (15,6%) pacientes não apresentaram nenhum histórico de sangramento na inclusão, sendo diagnosticados devido a história

familiar. A análise destes, quando comparados aos pacientes que apresentavam sintomas hemorrágicos no momento da inclusão, não demonstrou diferença nos níveis de citocinas, quimiocinas e MPs (dados não demonstrados). Estes dados sugerem que os níveis elevados de MPs nos pacientes em comparação aos controles seja resultante de ativação da coagulação secundária à hemorragias, ainda que de leve intensidade ou subclínicas. Por outro lado, os níveis aumentados de MPs derivadas de neutrófilos, monócitos e linfócitos podem ser resultantes de uma ativação global de leucócitos, possivelmente ocasionada pelo processo inflamatório consequente ao sangramento, ainda que mínimo. Entretanto, devido à ausência do fator VIII, a ativação da coagulação não é suficiente para gerar níveis de trombina adequados para conter o sangramento.

Após o início do tratamento com infusões de concentrado de fator, os níveis de MPs diminuíram, assim como observado no estudo de Mobarrez e colaboradores, que descreveram uma redução nos níveis de MPs totais, MPs derivadas de plaquetas e de endotélio, em pacientes com hemofilia após a infusão de fator VIII sob demanda (MOBARREZ et al., 2012). Tal como sugerido por estes autores, níveis reduzidos de MPs associam-se a uma hemostasia mais eficiente em pacientes com hemofilia tratados com concentrado de fator. Baixos níveis de MPs foram encontrados também nos controles do nosso estudo.

As MPs são fonte de fosfatilserina, que tem reconhecida função na agregação plaquetária e ativação da coagulação, através da expressão de fator tecidual (FT) e P-selectina. A P-selectina é uma molécula de adesão celular, expressa pelas plaquetas ativadas, que permite sua ligação com leucócitos, neutrófilos e monócitos. A interação entre plaquetas ativadas e monócitos ativados induz a formação de MPs que expressam FT, derivadas, principalmente, de monócitos e macrófagos (FURIE, 2004; DEL CONDE et al., 2005; MACEY et al., 2010). O FT também pode ser expresso na membrana das MPs derivadas de plaquetas, leucócitos e endotélio (LENTZ, 2003). Além disso, a fosfatilserina e fosfolipídeos expressos na membrana das MPs são capazes de se ligar a diversos fatores da cascata de coagulação como FIIa, FV, FVa, FVIII, FIX e FX (NOMURA et al., 2001; LENTZ, 2003; FURIE, FURIE, 2004; SOULT et al.,

2014). As MPs possuem, assim, papel importante na formação do complexo protrombinase, otimizando a geração de trombina e auxiliando na regulação da hemostasia (NOMURA et al., 2001; LENTZ, 2003; FURIE, FURIE, 2004; SOULT et al., 2014). Isso reforça a hipótese de que os elevados níveis de diferentes MPs nos pacientes com hemofilia A previamente não tratados sejam resultado da ativação da coagulação como tentativa de controlar o sangramento subclínico que estes pacientes parecem apresentar.

Marques et al., (2012) afirmam que as MPs podem carregar citocinas e quimiocinas em sua membrana. MPs derivadas de leucócitos induzem a amplificação de citocinas inflamatórias e aderência molecular, o que facilita a comunicação intercelular entre leucócitos e células endoteliais (MARQUES et al., 2012). Ainda, MPs derivadas de leucócitos atuam no endotélio como agonistas inflamatórios, aumentando a produção de IL-6 e IL-8, podendo ativar neutrófilos (MESRI & ALTIERI, 1998). O aumento da adesão de células na superfície endotelial, bem como a produção de citocinas, induz não somente a ativação plaquetária, como também o recrutamento de monócitos, que são estimulados a produzirem outras citocinas, resultando em uma resposta inflamatória (NOMURA et al., 2001).

O nosso estudo demonstrou níveis elevados das citocinas TNF, IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 nos pacientes com hemofilia previamente não tratados, quando comparado ao grupo controle. Estes dados corroboram estudos anteriores (CHAVES et al., 2010b; OLIVEIRA et al., 2013) que já haviam demonstrado que pacientes com hemofilia A sem inibidor apresentam perfil de citocinas pró-inflamatórias, com altos níveis de IL-2, INF- γ e TNF- α , ao contrário de pacientes com hemofilia e inibidor que apresentam baixos níveis dessas citocinas, caracterizando um perfil de resposta anti-inflamatória/regulatória (CHAVES et al., 2010b; OLIVEIRA et al., 2013). No entanto, de acordo com nosso conhecimento, nenhum estudo avaliou o perfil imunológico de pacientes com hemofilia previamente não tratados com fator VIII.

As citocinas exercem papel importante na inflamação, angiogênese e situações de injúria vascular (CRUVINEL et al., 2010). A IL-6 desempenha um papel duplo, podendo ser considerada uma citocina anti-inflamatória e pró-inflamatória, atuando

principalmente na ativação do sistema imune e estimulando a infiltração inicial de neutrófilos durante a inflamação aguda (CURFS & MEIS, 1997; SCHELLER et al., 2011). As IL-4 e IL-10 são citocinas características de resposta anti-inflamatória/regulatória, do tipo Th2, capaz de regular a resposta imunológica (VITELLI-AVELAR et al., 2005). Assim, sugerimos que IL-6 (e IL-8) sejam secretadas em resposta a uma inflamação inicial, causada por micro sangramentos sofridos pelos pacientes hemofílicos. Em resposta esse início inflamatório, citocinas como IL-4 e IL-10 podem ser estimuladas com objetivo de contrabalançar o microambiente, controlando a inflamação.

Nos pacientes com hemofilia A (n = 9) que já haviam recebido algumas infusões de fator VIII (mediana de zero dias; *IQR*, 0-3 dias; mínimo, zero e máximo, 4 dias), notamos que houve um aumento nos níveis não somente de IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10, como também de TNF, IFN- γ e IL-2, caracterizando um perfil pró-inflamatório. Esses dados corroboram os achados de Chaves e colaboradores (2010b), que evidenciaram altos níveis de TNF- α , IFN- γ e IL-4 em pacientes hemofílicos sem inibidor. Este grupo sugere que, durante a fase inicial do tratamento com fator VIII, uma resposta pró-inflamatória mediada por células T induz a produção de anticorpos IgG1 anti-FVIII sem atividade inibitória (CHAVES et al., 2010b).

Até o presente, não encontramos estudos que tenham descrito o perfil de quimiocinas em pacientes com hemofilia A. O presente estudo demonstrou níveis elevados de IL-8, e baixos níveis de MIG nos pacientes com hemofilia A recém-diagnosticados previamente não tratados, quando comparados aos controles. A IL-8 está relacionada com inflamação e angiogênese, sendo produzida principalmente por neutrófilos e macrófagos e desempenhando um importante papel em quadros de infecção e injúria vascular (KOCH et al., 1992; CURFS & MEIS, 1997). A quimiocina MIG atua na quimiotaxia de células T ativadas e a sua síntese é estimulada por IFN- γ . Como os pacientes previamente não tratados não apresentam níveis elevados de IFN- γ , é possível entender porque MIG está reduzida nesses indivíduos. Além disso, uma vez que esses indivíduos ainda não foram expostos e, portanto não desenvolveram resposta imunológica contra o fator VIII, ainda não houve estímulo para quimiotaxia de células T ativadas.

Os resultados de imunofenotipagem mostram um perfil heterogêneo dos marcadores celulares nos pacientes recém-diagnosticados em hemofilia, que deve ser confirmado comparando com a dosagem dos leucócitos no contexto *ex vivo* em controles saudáveis, que está sendo providenciado para complementação do nosso estudo.

Compilando os achados do presente estudo, sugerimos que o sangramento observado nos hemofílicos recém-diagnosticados previamente não tratados, ainda que subclínico, é capaz de gerar uma resposta inflamatória, mediada por citocinas e quimiocinas, além de ativar a coagulação através da produção de MPs. Uma vez que o sangramento não é controlado, devido à deficiência do fator VIII, existe uma produção de MPs que pode ativar a síntese de citocinas e IL-8, gerando o perfil pró-inflamatório identificado nestes pacientes.

O presente estudo requer alguns comentários. Uma das dificuldades enfrentadas foi garantir que a inclusão do paciente e, principalmente, a coleta da amostra ocorresse, de fato, antes da administração de qualquer infusão de fator VIII. Isso porque alguns pacientes apresentam urgência de iniciar o tratamento devido a sangramento ativo ao diagnóstico. Isso resultou na inclusão de 10 pacientes com até quatro dias de exposição ao concentrado de fator VIII. Ainda, por se tratar de crianças pequenas, a inclusão no projeto necessita da aprovação dos responsáveis e da coleta de amostra em momento específico. Não foi possível ainda testar controles saudáveis para imunofenotipagem, embora esta seja uma etapa em andamento. O projeto, porém, tem pontos fortes que incluem seu desenho prospectivo. De acordo com nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia o perfil imunológico com grande número de citocinas, quimiocinas e MPs de pacientes com hemofilia A previamente não tratados.

A perspectiva futura deste projeto é relacionar o perfil imunológico encontrado no momento do diagnóstico ao perfil encontrado após 75 dias de exposição aos fatores VIII ou IX, sem desenvolvimento de anticorpos, ou após o diagnóstico confirmado de inibidor, nos pacientes que o desenvolverem. Também pretendemos relacionar o perfil imunológico com as avaliações clínicas e com os resultados do perfil genético de cada paciente. Ainda, é nosso objetivo realizar novas inclusões de pacientes com

hemofilia B, permitindo a comparação entre os fatores de risco nos dois tipos da doença, assim, poderemos verificar a existência de novos fatores preditores para o desenvolvimento de inibidores e testar se a modulação do sistema imune durante o tratamento é fundamental.

Em conclusão, demonstramos que pacientes com hemofilia A recém-diagnosticados e previamente não tratados, em comparação com controles normais, apresentam aumento de MPs derivadas de plaquetas, leucócitos, monócitos, neutrófilos, eritrócitos e linfócitos T, altos níveis das citocinas TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2, nível elevados da quimiocina IL-8 e reduzido de MIG, condizente com perfil pró-inflamatório. Sugerimos que esse quadro seja resultante de microhemorragias e/ou sangramentos subclínicos, que levam a ativação da coagulação e inflamação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, Horst J, de Moerloose P, et al. Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study. *Blood*. v. 86, p. 2206-2212, 1995.

Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, and Lefvert AK. Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood*. v. 107. p. 3167-72, 2006.

Bafunno V, Santacroce R, Chetta M, D'Andrea' G, Pisanelli D, Sessa F, Trotta T, Tagariello G, Peyvandi F, Margaglione M. Polymorphisms in genes involved in autoimmune disease and the risk of FVIII inhibitor development in Italian patients with haemophilia A. *Haemophilia*. p. 1-5, 2009.

Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 2 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe haemophilia A. *Blood*. v. 99. p. 168-174, 2002.

Berntorp E, Astermark J, Björkman S, Blanchette VS, Fischer K, Giangrande PL, Gringeri A, Ljung RC, Manco-Johnson MJ, Morfini M, Kilcoyne RF, Petrini P, Rodriguez-Merchan EC, Schramm W, Shapiro A, van den Berg HM, Hart C. Consensus perspectives on prophylactic therapy for haemophilia: summary statement. *Haemophilia*. v. 1. p. 1-4, 2003.

Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost*. v. 101. p. 439-51, 2009.

Calvez T, Chambost H, Claeysens-Donadel S, d'Oiron R, Goulet V, Guillet B, Héritier V, Milien V, Rothschild C, Roussel-Robert V, Vinciguerra C, Goudemand J. Recombinant factor VIII products and inhibitor development in previously untreated boys with severe hemophilia A. *Blood*, v. 23. p. 124, 2014.

Chaves DG, Velloso-Rodrigues C. Desenvolvimento de inibidores do fator VIII na hemofilia A. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 2008.

Chaves DG, Belisário AR, Castro G, Santoro MM, Velloso-Rodrigues C. Analysis of cytokine genes polymorphism as markers for inhibitor development in haemophilia A. *International Journal Immunogenetics*, v. 37, p. 79-82, 2010a.

Chaves, DG, Velloso-Rodrigues, C, Oliveira, CA, Teixeira-Carvalho, A, Santoro, MM, Martins-Filho, OA. A shift towards a T cell cytokine deficiency along with an anti-inflammatory/regulatory microenvironment may enable the synthesis of anti-FVIII inhibitors in haemophilia A patients. *Clinical and Experimental Immunology*. v. 162(3), p. 425-437, 2010b

Collins P, Palmer B, Chalmers E, Hart D, Liesner R, Rangarajan S, Talks K, Williams M, Hay C. Factor VIII brand and the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated UK children with severe hemophilia A, 2000-2011. *Blood*, v. 23. p. 124, 2014.

Cruvinel W, Mesquita D, Araújo JA, Catelan TT, Souza AW, Silva NP, Andrade LE. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reumatol*. v. 50(4). p. 434-61, 2010.

Curfs JH, Meis JF, Hoogkamp-Korstanje JA. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev*. v. 10. p. 742-780, 1997.

Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*. v. 145, p. 1310-1312, 1964.

Dimichele DM. Inhibitors: resolving diagnostic and therapeutic dilemmas. *Haemophilia*. v. 8. p. 280-287, 2002.

Dimichele DM. Inhibitors in haemophilia: a primer. World Federation of Hemophilia, Fourth Edition. New York, U.S.A. 2008.

Distler JH, Huber LC, Gay S, Distler O, Pisetsky DS. Microparticles as mediators of cellular cross-talk in inflammatory disease. *Autoimmunity*. v. 39(8). p. 683-90, 2006.

Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez J. Tissue-factor-bearing microparticles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*, v. 106, p. 1604-1611, 2005.

Ferreira CN, Sousa MO, Dusse LMS, Carvalho MG. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. v. 32(35). p. 416-421, 2010.

Furie B, Furie BC. Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *Trends Mol Med*. v. 10. p. 171-178, 2004.

Gailani D, Renne T. The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thromboembolic disease? *J Thromb Haemost.* v. 5(6), p. 1106–1112, 2007.

Gueddings JE, Mackman N. Recently Identified Factors that Regulate Hemostasis and Thrombosis. *Thromb Haemost.* v. 111(4). p. 570–574, 2014.

Gilles JG, Arnout J, Vermylen J, Saint-Remy JM. Anti-factor VIII antibodies of hemophiliac patients are frequently directed towards nonfunctional determinants and do not exhibit isotypic restriction. *Blood.* v. 82, p. 2452-2461, 1993.

Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature.* v.312, p. 326-330, 1984.

Goudemand J, Rothschild C, Demiguel V, Vinciguerrat C, Lambert T, Chambost H, et al. Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. *Blood.* v. 107(1). p. 46-51, 2006.

Gouw SC, van der Bom JG, Auerswald G et al. Recombinant vs. plasma-derived factor VIII products and the development of inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood.* v. 109. p. 4693-7. 2007a.

Gouw SC, van der Berg H, Cessie LE, Van der Bom JG. Treatment characteristics and the risk of inhibitor development: a multicenter cohort study among previously untreated patients with severe hemophilia A. *Journal of Thrombosis and Haemostasis,* v. 5. p. 1383–1390, 2007b.

Gouw SC, Van der Bom JG, Marijke van der Berg H. Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood.* v. 109. p. 4648-54, 2007c.

Gouw SC, Van der Bom JG, Ljung R, et al. Factor VIII products and inhibitor development in severe hemophilia A. *N Engl J Med.* v. 368. p. 231–9, 2013a.

Gouw SC, van den Berg HM, Fischer K, Auerswald G, Carcao M, Chalmers E, Chambost H, Kurnik K, Liesner R, Petrini P, Platokouki H, Altisent C, Oldenburg J, Nolan B, Garrido RP, Mancuso ME, Rafowicz A, Williams M, Clausen N, Middelburg RA, Ljung R, van der Bom JG; PedNet and Research of Determinants of INhibitor development (RODIN) Study Group. Intensity of factor VIII treatment and inhibitor development in children with severe hemophilia A: the RODIN study. *Blood.* 121(20). p. 4046-55, 2013b.

Hoffman M, Monroe DM. A Cell-based Model of Hemostasis. *Tromb Haemost.* v. 85. p. 958-965, 2001.

Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Rev.* v. 17 (Suppl 1). p. S1-5, 2003.

Hoffman M, Monroe DM. Coagulation 2006: A Modern View of Hemostasis. *Hematology Oncology Clinics.* v. 21. p. 1-11, 2007.

Jacquemin MG, Saint-Remy JM. Factor VIII Immunogenicity. *Hemophilia.* v. 4. p. 552-557, 1998.

Kasper C, Aledort LM, Counts RB, Edson JR, Fratantoni J, Green D. A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemor.* v. 34. p. 869-872, 1975.

Kaushansky K, Lichtman MA, Beutker E, Kipps TJ, Seligsohn U, Prchal JT. *Williams Hematology.* Eighth Edition. McGrawHill. p. 1826-1827, 2011.

Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science.* v. 258. p. 1798-1801, 1992.

Lavigne-Lissalde G, Rothschild C, Pouplard C, Lapalud P, Gruel Y, Schved JF, Granier C. Characteristics, mechanisms of action, and epitope mapping of anti-factor VIII antibodies. *Clin Rev Allergy Immunol.* v. 37(2). p. 67-79, 2009.

Lentz BR. Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Prog Lipid Res.* v. 42(5). p. 423-38, 2003.

Lollar P. Pathogenic Antibodies to Coagulation Factors. Part one: Factor VIII and Factor IX. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* v. 2. p. 1082-1095, 2004.

Macey MG, Bevan S, Alam S, Verghese L, Agrawal S, Beski S, Thuraisingham R, Maccallum PK. Platelet activation and endogenous thrombin potential in pre-eclampsia. *Thrombosis research,* v. 125, n. 3, p. 76-81, 2010.

Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. *Nature.* v. 202, p. 498-499, 1964.

Marcus AJ, Safier LB. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *Faseb J.* v. 7(6), p. 516-522, 1993.

Marques FK, Campos FM, Filho OA, Carvalho AT, Dusse LM, Gomes KB. Circulating microparticles in severe preeclampsia. *Clin Chim Acta.* v. 24;414. p. 253-8, 2012.

Mause SF, Weber C: Microparticles: Protagonists of a Novel Communication Network for Intercellular Information Exchange. *Circ Res,* v. 107. p. 1047-1057, 2010.

Mesquita D, Araújo já, Catelan TT, Souza AW, Cruvinel WM, Andrade LE, Silva NP. Immune system - part II: basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. *Rev. Bras. Reumatol.* v. 50. p. 552-580, 2010.

Mesri M, Altieri DC: Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J Immunol*, v. 161. p. 4382-4387, 1998.

Meziani F, Tesse A, Andriantsitohaina R: Microparticles are vectors of paradoxical information in vascular cells including the endothelium: role in health and diseases. *Pharmacol Rep.* v. 60. p. 75-84, 2008.

Ministério da Saúde. Hemofilia Congênita e Inibidor: Manual de Diagnóstico e Tratamento de Eventos Hemorrágicos, 2009.

Morel N, Morel O, Delabranche X, Jesel L, Sztark F, Dabadie D, Freyssinet M, Toti F. Microparticles during sepsis and trauma. A link between inflammation and thrombotic processes *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation.* v. 25. p. 955–966, 2006.

Mobarrez F, Mikovic D, Antovic A, Antovic J. A decrease of microparticles related to improvement of hemostasis after FVIII injection in hemophilia A patients treated on demand? *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 11. p. 697–703, 2013.

Murphy KM. T lymphocyte differentiation in the periphery. *Curr Opin Immunol.* v. 10, p. 226-232, 1998.

Mukherjee S, Saha A, Biswas P, Mandal C, Ray K. Structural analysis of factor IX protein variants to predict functional aberrations cau sing haemophilia B. *Haemophilia.* v. 14. p. 1076-81, 2008.

Naylor JA, Green PM, Rizza CR, Giannelli F. The factor VIII gene explains all cases of haemophilia A. *Lancet.* v. 340. p. 1066–7, 1992.

Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, Cone J, Fukuhara S, Kambayashi J: Highshear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis*, v. 158. p. 277-287, 2001.

Oliveira CA, Veloso-Rodrigues C, Machado FC, Carvalho BN, Gentz SH, Martins-Filho OA, et al, Cytokine profile and FVIII inhibitors development in haemophilia A. *Haemophilia.* v. 19.3. p. 139-142, 2013.

Pio SF, Oliveira GC, Rezende SM. The molecular basis of hemophilia A. *Revista da Associação Médica Brasileira.* v. 55. p. 213-219, 2009.

Proulle V, Hugel B, Guillet B, Trichet C, Rafowicz A, Lambert T, Freyssinet J-M, Dreyfus M. Injection of recombinant activated factor VII can induce transient increase in circulating procoagulant microparticles. *Thromb Haemost.* v. 91. p. 873–8, 2004. Proulle V, Hugel B, Guillet B, Grunebaum L, Lambert T, Freyssinet J-M, Dreyfus M. Circulating microparticles are elevated in haemophiliacs and non-haemophilic individuals aged. *Br J Haematol.* v. 131. p. 487–9, 2005.

Rezende SM. Distúrbios da hemostasia. *Revista Médica de Minas Gerais*, 2010.

Santos A, Annichino-Bizzacchi JM, Ozelo MC. Inhibitors of factor VIII in haemophilia. *N Engl J Med.* v. 361. p. 309–10, 2009.

Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta* v. 1813. p. 878–888, 2008.

Schwaab R, Brackmann HH, Meyer C, et al. Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. *Thrombosis and Haemostasis.* v.74, p. 1402-1406, 1995.

Smith SA, DacvimMS. The cell-based model of coagulation. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care.* v. 19. p. 3-10, 2009.

Soult M, Dobrydneva Y, Wahab K, Britt L, Sullivan C. Outer membrane vesicles alter inflammation and coagulation mediators *journal of Surgical research.* v. 192. p. 134-142, 2014.

Vaz NM, Faria AC. Para uma forma diferente de se compreender o sistema imune vide: *Guia Incompleto de Imunobiologia.* 1. Ed. Belo Horizonte: Coopmed Editora, 1993.

Vehar GA, Keyt B, Eaton D, Rodriguez H, O'Brien DP, Rotblat F, Oppermann,, H, Keck R, Wood WI, Harkins RN. Structure of human factor VIII. *Nature*, v. 312, p. 337-342, 1984.

Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Bozeman J, Van Den Berg M, Mauser-Bunchoten E. The Nijmegen modification of Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. *Thrombosis and Haemostasis.* v.73, p. 247-251, 1995.

Viel KR, Ameri A, Abshire TC, Iyer RV, Watts RG, Lutcher C, et al. Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia. *N Engl J Med.* v. 360. p. 1618-27, 2009.

Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Dias JC, Pascoal VP, Teixeira- Carvalho A, Lage PS, Eloi-Santos SM, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3 β CD16 β CD56 β natural killer T cells and CD4 β CD25 High regulatory T lymphocytes. *Scand J Immunol.* v. 62. p. 297–308, 2005.

Wan Y. Multi-tasking of helper T cells. *Immunology*. v. 10.1111. p. 1365-2567, 2010.

Warrier I, Lusher JM. Development of anaphylactic shock in haemophilia B patients with inhibitors. *Blood Coagul Fibrinolysis*. v. 1 .p. 125-8, 1998.

White G, Rosendaal F, Aledort L, et al. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost*. v. 85. p. 560, 2001.

White GC, Kempton CL, Grimsley A, Nielsen B, Roberts HR. Cellular immune response in hemophilia: Why do Inhibitors Develop in some, but not all hemophiliacs? *Thromb Haemost*. v. 3. p. 1676-1681, 2005.

Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*. v. 13(3). p. 269–88, 1967.

Wood WI, Capon DJ, Simonsen CC, Eaton DL, Gitshier J, Keyt B, Seeburg PH, Smith DH, Hollingshead P, Wion KL. Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature*, v. 312. p. 330-337, 1984.

Apêndice A – Tabela suplementar

Tabela suplementar 1. Anticorpos utilizados para fenotipagem leucocitária

Hospedeiro	Alvo	Fluorocromo	Clone	Fabricante
Mouse anti-human	CD3	FITC	HIT3a	BD Pharmingen
Mouse anti-human	CD4	FITC	OKT4	Bioscience
Mouse anti-human	CD5	FITC	L17F12	BD Pharmingen
Mouse anti-human	CD8	APC	RPA-T8	Bioscience
Mouse anti-human	CD14	PerCP	61D3	Bioscience
Mouse anti-human	CD16	FITC	3G8	Invitrogen
Mouse anti-human	CD19	FITC	SJ25C1	BD Pharmingen
Mouse anti-human	CD19	APC	HIB19	BD Pharmingen
Mouse anti-human	CD20	APC	2H7	BD Pharmingen
Mouse anti-human	CD25	PE	M-A251	BD Pharmingen
Mouse anti-human	CD27	PerCP-Cy5.5	L128	BD Pharmingen
Mouse anti-human	CD32	FITC	FLI8.26 (2003)	BD Pharmingen
Mouse anti-human	CD56	PE	C5.9	AbD Serotec (Bio-Rad)
Mouse anti-human	CD64	FITC	10.1	BD Pharmingen
Mouse anti-human	CD80	PE	L307.4	BD Pharmingen
Mouse anti-human	CD86	PE-Cy5	2331 (FUN-1)	BD Pharmingen
Mouse anti-human	HLA-DR	PE	TU36	BD Pharmingen

PE, *Phycoerythrin*; APC, *Allophycocyanin*, PerCP, *Peridininchlorophyll protein*; PECy5, *Phycoerythrin-Cyanin 5.1*; Cy 5.5, *Peridinin-chlorophyllprotein 5.5*; CD, *cluster of differentiation*.

Apêndice B – Tabela suplementar

Tabela suplementar 2. Dados clínicos dos pacientes incluídos

ID	Idade atual	Cor	Nacionalidade	Parto	Histórico familiar*	Tipo de hemofilia	DE na inclusão	Motivo diagnóstico
MG/001	2a11m	Pardo	Brasileiro	Cesária	Avô materno	A grave	1	Sangramento
MG/002	2a7m	Branco	Brasileiro	Cesária	3 tios	A grave	1	Sangramento
MG/003	2a4m	Branco	Brasileiro	Normal	Irmão / Tio materno	B grave	4	Sangramento
MG/004	5a7m	Negro	Brasileiro	Cesária	Não	A grave	Zero	Sangramento
MG/005	2a11m	Negro	Brasileiro	Normal	Tios maternos	B leve	Zero	Sangramento
MG/006	1a11m	Negro	Brasileiro	Normal	Primo/Tio/Irmão	A grave	2	Sangramento
MG/007	1a (Falecido)	Branco	Brasileiro	Normal	Avô/Primo/Tio	A grave	Zero	Sangramento
MG/008	2a3m	Branco	Brasileiro	Cesária	Tio materno	A grave	4	Sangramento
MG/009	1a3m	Branco	Brasileiro	Normal	Tio-avô/Tio	A grave	4	Sangramento
MG/010	2a3m	Branco	Brasileiro	Cesária	Tios maternos	A moderada	2	Sangramento
MG/011	1a11m	Branco	Brasileiro	Cesária	Avô materno/irmão gêmeo	A moderada	Zero	Sangramento
MG/012	2a	Branco	Brasileiro	Cesária	Não	A grave	2	Sangramento
MG/013	1a11m	Branco	Brasileiro	Cesária	Avô materno/irmão gêmeo	A grave	Zero	Irmão gêmeo diagnosticado
MG/014	1a6m	Branco	Brasileiro	Cesária	Não	A grave	Zero	Sangramento
MG/015	1a10m	Branco	Brasileiro	Cesária	Não	B grave	Zero	Sangramento
MG/016	2a3m	Branco	Brasileiro	Cesária	Não	A grave	Zero	Sangramento

*Histórico de hemofilia na família. ID, identificação do paciente; a, anos; m, meses

Tabela suplementar 2. Dados clínicos dos pacientes incluídos

ID	Idade atual	Cor	Nacionalidade	Parto	Histórico familiar*	Tipo de hemofilia	DE na inclusão	Motivo diagnóstico
ES/001	2a11m	Branco	Brasileiro	Cesária	Tios/Primos	A grave	Zero	Histórico familiar
ES/002	1a3m	Índio	Brasileiro	Normal	Não	A grave	Zero	Sangramento
ES/003	2a2m	Negro	Brasileiro	Cesária	Primos	A grave	4	Sangramento
ES/004	5a1m	Negro	Brasileiro	Cesária	Primos	A leve	Zero	Sangramento
PR/001	2a1m	Branco	Brasileiro	Cesária	Tio avô	A grave	Zero	Sangramento
PR/002	2a1m	Pardo	Brasileiro	Normal	Tio materno	A grave	Zero	Sangramento
PR/003	2a6m	Branco	Brasileiro	Cesária	Não	A grave	Zero	Hemartrose joelho E
PR/004	1a	Branco	Brasileiro	Cesária	Não	A grave	Zero	Sangramento
RJ/001	1a6m	Branco	Brasileiro	Cesária	Primo 1º grau	A grave	Zero	Histórico familiar
RJ/002	2a	Branco	Brasileiro	Cesária	Não	A grave	zero	Sangramento
RJ/003**								
RJ/004	2a	Branco	Brasileiro	Cesária	Não	A grave	3	Sangramento
RJ/005	1a5m	Branco	Brasileiro	Normal	Não	A grave	Zero	Equimoses e Hematomas
RJ/006	1a7m	Índio	Brasileiro	Cesária	Não	B moderada	Zero	Sangramentos
RJ/007	1a3m	Pardo	Brasileiro	Cesária	Irmão	A grave	Zero	Histórico familiar
RJ/008	1a2m	Branco	Brasileiro	Cesária	Não	A grave	Zero	Sangramento
RJ/009	7m	Pardo	Brasileiro	Cesária	Avô materno/ tios/Primos	A grave	Zero	Histórico familiar

*Histórico de hemofilia na família. **Paciente sem dados clínicos, excluído do estudo. ID, identificação do paciente; a, anos; m, meses

Apêndice C – Tabela complementar

Tabela complementar 3. Quantificação celular obtida através de imunofenotipagem.

	CD14+ HLA-DR+	CD16+ HLA-DR+	CD14+ CD64+	CD14+ CD32+	CD4 HLA-DR	CD8 HLA-DR	CD3+ CD16+	CD3+ CD56-	CD4+ CD25+	CD19+ CD5+	CD19+ CD27+	CD19+ CD80+	CD19+ CD86+	CD19+ HLA-DR+	CD19+ CD32+	CD19+ CD20+
MG/01	8425,3	19831,8	13354	18263,4	4,2	5,3	29,9	1,4	11,9	4,5	5,8	1,1	1,5	26679,1	10624,1	3416
MG/02	6625,3	3848,8	921	18118,8	2,3	7	42,7	1,6	6,2	1,3	11,8	0,1	0,8	23209,9	14580,6	309,7
MG/04	8065,3	16635,2	10867,4	18234,5	4,1	5,7	31,1	1,4	2,1	4	6,3	0,8	1,3	25985,2	11415,4	2794
MG/06	3138,8	6635,1	16464	18284,4	1,6	5,2	17,2	1,3	7	5,4	7,3	6,4	0,6	1217,9	14077,6	6077,5
MG/07	1952,7	2444,6	20349,8	18325,8	4,8	6,9	19,8	0,4	3,3	9,3	6,2	1	2,6	1108,2	7317,7	4178
MG/08	9069,4	*	12997,5	19978,9	9,5	0,9	13,9	0,2	6,5	6,5	11,3	0,8	1,8	34693,9	10913,4	3776,2
MG/09	395,2	579,8	13663,6	24523,8	6,3	1,9	15,4	0,2	10,4	1,2	0,8	0,5	1,3	22643,8	5805,8	3361,8
MG/10	5551,9	19297,1	5128,2	23349	4,8	2,4	19,5	0,6	10,1	13,8	0,6	0,5	1,1	26661,2	11680,8	1048,2
MG/11	27310,8	299,4	4067,8	20238,1	1,8	2	26,9	0,7	9,7	3,9	9,2	1,2	1,3	28350,3	11613,7	2889,4
MG/12	464	799,1	32522,9	3363,2	3,1	10,2	13,5	0,4	1	6,2	1,6	1,3	4	243,7	7453,6	2967,5
MG/13	326,3	360,4	14862,8	27090,4	7	5,9	44	0,2	10,1	2,4	1,7	1,4	3,4	47713,3	13703,2	6204,7
MG/14	12918,9	736,1	11725,7	24398,4	2,8	3,4	16,2	0,7	7,7	8,8	11,2	1,4	1,1	31323,2	14323,6	4800,2
MG/15	6455,8	195,4	9200,2	30872,5	2,5	4	16,4	0,7	11,9	11,9	7,2	3,2	0,7	19810,3	11026,3	297,2
MG/16	1276,09	393,04	20585,4	41086,59	3,77	10,95	8,1	1,67	14,96	42,67	13,33	10,73	1,55	2788,08	24859,72	2663,56
MG/17	573,77	19382,97	19172,99	4828,73	1,24	0,41	43,36	0,2	14,55	43,29	7,18	8,91	6,22	1162,52	16335,17	3309,06
MG/18	3448,97	17398,68	39983,3	60221,67	3,25	4,66	4,27	0,82	10,24	41,54	4,61	6,84	4,67	6517,5	23543	6593,28
ES/01	2150,4	24448,3	15473,6	18200,9	4,9	6,6	21	1,8	13,8	4,8	11,6	0,8	1,8	14698,6	10489,8	3849,9
ES/02	3015,3	23063,3	15057,2	18889,5	4,4	5,3	22,2	1,5	16,3	6,3	9	1	1,6	17555,1	10534,5	3260,1
ES/03	20110,2	11983,8	9531,3	17699,8	4,6	8,7	44	1	11	3,2	1,1	1,2	1,2	47783,5	10847,9	3136,6
Media	6383	9352	15049	22419	4,051	5,127	23,65	0,8837	9,408	11,63	6,727	2,588	2,028	20008	12692	3418
Mediana	3449	5242	13664	18890	4,1	5,3	19,8	0,7	10,1	6,2	7,18	1,2	1,5	22644	11415	3309
1o quartil	1276	533,1	9531	18201	2,5	2,4	15,4	0,4	6,5	3,9	1,7	0,8	1,1	2788	10535	2794
3o quartil	8425	19319	19173	24524	4,8	6,9	31,1	1,4	11,9	11,9	11,2	3,2	2,6	28350	14324	4178
Mínimo	326,3	195,4	921	3363	1,24	0,41	4,27	0,2	1	1,2	0,6	0,1	0,6	243,7	5806	297,2
Máximo	27311	24448	39983	60222	9,5	10,95	44	1,8	16,3	43,29	13,33	10,73	6,22	47784	24860	6593

* Ausência de resultado devido à impossibilidade de compensação do marcador

