

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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS INFUSÕES DE FATOR VIII SOBRE
BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS EM CRIANÇAS COM HEMOFILIA A**

Larissa Maira Moura de Oliveira

Belo Horizonte, 2019

Larissa Maira Moura de Oliveira

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS INFUSÕES DE FATOR VIII SOBRE
BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS EM CRIANÇAS COM HEMOFILIA A**

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: Profa. Dra. Suely Meireles Rezende

Coorientador: Dr. Daniel Gonçalves Chaves

Belo Horizonte, 2019

Oliveira, Larissa Maira Moura de.
OL48a Avaliação do efeito das infusões de fator VIII sobre biomarcadores imunológicos em crianças com hemofilia A [manuscrito]. / Larissa Maira Moura de Oliveira. -- Belo Horizonte: 2019.
110 f.: il.
Orientador (a): Suely Meireles Rezende.
Coorientador (a): Daniel Gonçalves Chaves.
Área de concentração: Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Hemofilia A. 2. Fator VIII /antagonistas & inibidores. 3. Imunidade nas Mucosas. 4. Biomarcadores. 5. dissertação Acadêmica. I. Rezende, Suely Meireles. II. Chaves, Daniel Gonçalves. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WH 325

Bibliotecária responsável: Fabiene Letizia Alves Furtado CRB-6/2745



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



FOLHA DE APROVAÇÃO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS INFUSÕES DE FATOR VIII SOBRE BIOMARCADORES
IMUNOLÓGICOS EM PACIENTES COM HEMOFILIA A**

LARISSA MAIRA MOURA DE OLIVEIRA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, área de concentração CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO.

Aprovada em 01 de agosto de 2019, pela banca constituída pelos membros:

Profª. Suely Meireles Rezende - Orientadora
UFMG

Prof. Daniel Gonçalves Chaves - Coorientador
HEMOMINAS

Profª. Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis
UFMG

Profª. Clara Guerra Duarte
FUNED

Belo Horizonte, 01 de agosto de 2019.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitora

Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-Reitor

Alessandro Fernandes Moreira

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Fábio Alves

Pró-Reitor de Pesquisa

Mário Campos

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor

Professor Humberto José Alves

Chefe do Departamento de Clínica Médica

Professora Valeria Maria Augusto

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

Coordenadora

Professora Teresa Cristina Abreu Ferrari

Subcoordenadora

Professora Suely Meireles Rezende

Colegiado

Professora Tereza Cristina Abreu Ferrari

Professora Sarah Teixeira Camargos

Professora Gilda Aparecida Ferreira

Professor. Paulo Caramelli

Professor Eduardo Garcia Vilela

Professora Suely Meireles Rezende

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado força para vencer o cansaço, por não ter me deixado desistir nos momentos mais difíceis e por me mostrar sempre o caminho certo a seguir.

Aos meus amados pais Alfredo e Claudiana pelo amor, incentivo, apoio, por todo o cuidado e dedicação.

Ao meu marido Charles pelo companheirismo, compreensão e apoio. Agradeço por não medir esforços para me ajudar em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador Dr. Daniel Gonçalves Chaves pela paciência, confiança e apoio. Agradeço por todos esses anos de ensinamentos, por não ter me deixado desamparada, por todas as oportunidades, pela amizade e bom humor de sempre o que tornou a pós-graduação mais leve. Obrigada pela companhia, auxílios nos experimentos e por ter me acudido nos momentos mais difíceis dessa jornada.

À minha orientadora Dra. Suely Meireles Rezende pela oportunidade, apoio, carinho e paciência.

Ao Dr. André Rolim Belisário por ter me concedido a primeira oportunidade na iniciação científica, por todos os ensinamentos e paciência. Obrigada por ter sido o responsável pelo início da minha carreira científica.

Aos pacientes e funcionários da Fundação HEMOES, HEMOMINAS, HEMORIO, HEMEPAR E HEMOSC pela disponibilidade em participar deste estudo.

Aos meus queridos amigos da Fundação HEMONINAS que durante todos esses anos alegraram os meus dias. Obrigada pela amizade e convivência tão agradável.

À Alexandra Elbakyan pela coragem em dar acesso ao material científico que foi essencial para o desenvolvimento deste estudo.

A todos os meus amigos e familiares pela torcida, carinho e orações.

RESUMO

A hemofilia A (HA) é um distúrbio de sangramento hereditário causado por deficiência de fator (F) VIII. Seu tratamento baseia-se na reposição de FVIII deficiente, tanto profilaticamente quanto sob demanda. Uma das principais complicações da HA é o desenvolvimento de aloanticorpos que inibem a atividade do FVIII (inibidores). Estudos recentes sugerem que o tratamento com infusões repetidas de concentrado de FVIII pode alterar a resposta imune e, portanto, contribui para o desenvolvimento de inibidores. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito das infusões de concentrado de FVIII sobre biomarcadores imunológicos de pacientes com HA congênita (PHA). A maioria (80,3%) dos PHA foram incluídos ao diagnóstico e antes de qualquer infusão de FVIII (PUPs; da sigla em inglês, *previously untreated patients*). Variáveis sociodemográficas, clínicas e laboratoriais foram coletadas. Amostras de plasma foram coletadas na inclusão (T0) e a cada 5-10 dias de exposição (DE) ao FVIII até pelo menos 75 DE (T1/INB-) ou desenvolvimento de inibidor (T1/INB+). Os anticorpos anti-FVIII (IgM, IgG1, IgG3 e IgG4) foram testados por ELISA, bem como um painel de quimiocinas (CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10) e citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF e IL-17A). Análise estatística descritiva das variáveis e correlação de Spearman entre os biomarcadores foram realizadas. Um total de 71 pacientes com HA grave (FVIII <1%; n=69) e moderadamente grave (FVIII 1%-2%; n=2) foram incluídos. A mediana de idade foi 10 meses (intervalo interquartil [IQR], 6,0-14,0). Em T0, não houve diferença no perfil de citocinas e quimiocinas entre INB- e INB+. Os níveis de CCL2, CXCL9 e CXCL10 foram significativamente menores ($p=0,02$, $p=0,0001$ e $p=0,02$, respectivamente) no grupo INB+ quando comparado com o INB- no estrato 1-20 DE. Os níveis de IgG4 anti-FVIII no grupo INB+ foram significativamente maiores nos estratos 1-20 DE ($p=0,001$) e 21-75 DE ($p=0,01$) quando comparados com T0. IgG4 anti-FVIII no grupo INB+ foi significativamente maior no estrato 1-20 DE ($p=0,01$) quando comparado com o INB-. IgG1 não mostrou diferença significativa entre os dois grupos nem entre os diferentes estratos, mas houve uma tendência de aumento dos níveis no grupo INB+ no estrato 1-20 DE ($p=0,08$). Concluímos que a infusão de FVIII associou-se a níveis aumentados de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e aumento dos níveis de IgG1 e IgG4 anti-FVIII em pacientes INB+. Estes resultados sugerem que o FVIII atua modulando seletivamente o sistema imunológico. As

quimiocinas (CCL2, CXCL9 e CXCL10) são os elementos-chave que diferenciam os grupos INB- e INB+ durante as primeiras exposições ao FVIII.

Palavras-chave: Hemofilia A, Fator VIII, inibidores, resposta imunológica, biomarcadores imunológicos.

ABSTRACT

Hemophilia A (HA) is an inherited bleeding disorder caused by factor (F)VIII deficiency. Its treatment is based on the replacement of deficient FVIII either prophylactically or on demand. One of the major complications of HA is the development of alloantibodies that inhibit FVIII activity (inhibitors). Recent studies suggest that treatment with repeated infusions of FVIII concentrate may alter the immune response and, therefore, contributes to inhibitor development. The objective of this study was to investigate the effect of infusions of FVIII concentrate on immunological biomarkers of patients with congenital HA (PHA). Most (80.3%) PHA were included at diagnosis and before any FVIII infusion (PUPS; previously untreated patients). Socio-demographic, clinical and laboratory variables were collected. Plasma samples were collected at enrollment (T0) and every 5-10 exposure days (ED) to FVIII until at least 75 ED (T1/INB-) or inhibitor development (T1/INB+). Anti-FVIII antibodies (IgM, IgG1, IgG3 and IgG4) were tested by ELISA as well as a panel of chemokines (CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 and CXCL10) and cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, INF- γ , TNF and IL-17A). Descriptive statistical analysis of variables and Spearman correlation between biomarkers were performed. A total of 71 patients with severe (FVIII <1%; n=69) and moderately severe (FVIII 1%-2%; n=2) HA were included. The median age was 10 months (interquartile range [IQR], 6.0-14.0). At T0, there was no difference in the cytokine and chemokine profile between INB- and INB+. The levels of CCL2, CXCL9 and CXCL10 were significantly lower ($p=0.02$, $p=0.0001$ and $p=0.02$, respectively) in the INB+ group when compared with the INB- in the 1-20 ED stratum. Anti-FVIII IgG4 levels in the INB+ group were significantly higher in the strata 1-20 ED ($p=0.001$) and 21-75 ED ($p=0.01$) when compared with T0. Anti-FVIII IgG4 in the INB+ group was significantly higher in the 1-20 ED stratum ($p=0.01$) when compared with INB-. IgG1 showed no significant difference between the two groups nor between the different strata, but there was a trend of increased levels in the INB+ group in the 1-20 DE stratum ($p=0.08$). We conclude that infusion of FVIII was associated with increased levels of pro-inflammatory cytokines, chemokines, anti-FVIII IgG1 and IgG4 in INB+ patients. These results suggest that FVIII acts by selectively modulating the immune system. Chemokines (CCL2, CXCL9 and CXCL10) are the key elements that differentiate the INB- and INB+ groups during the first exposures to FVIII.

Keywords: Hemophilia A, Factor VIII, inhibitors, immune response, immunological biomarkers.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na reação da Inv22	41
Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados na reação da Inv1	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo clássico da coagulação sanguínea.....	18
Figura 2. Modelo celular da coagulação.....	19
Figura 3. Estrutura primária e ativação do FVIII.....	21
Figura 4. Ativação da resposta imune pelo FVIII exógeno e formação de anticorpos inibidores.....	29
Figura 5. Delineamento do estudo.	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC: *Antigen Presenting Cell* - Célula apresentadora de antígeno

CBA: *Cytometric Bead Array*

CCL: C-C Motif Chemokine Ligand

CTLA4: *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4* - Antígeno 4 dos linfócitos T citotóxicos

CXCL: C-X-C Motif Chemokine Ligand

DE: Dias de exposição

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DO: Densidade óptica

dpFVIII: Fator VIII derivado de plasma humano

ELISA: *Enzyme linked immunosorbent assay* - Ensaio de imunoabsorção enzimática

FMH: Federação Mundial de Hemofilia

F8: Gene do fator VIII

FV: Fator V da coagulação

FVa: Fator V ativado

FVII: Fator VII da coagulação

FVIII: Fator VIII da coagulação

FVIIIa: Fator VIII ativado

FVIII:C: Determinação da atividade coagulante do FVIII

FIX: Fator IX da coagulação

FIXa: Fator IX ativado

FX: Fator X da coagulação

FXa: Fator X ativado

FXI: Fator XI da coagulação

FXIa: Fator XI ativado

FXII: Fator XII da coagulação

FXIIa: Fator XII ativado

FXIII: Fator XIII da coagulação

FXIIIa: Fator XIII ativado

FT: Fator tecidual

FvW: Fator de von Willebrand

GITR: *Glucocorticoid-induced Tumor Necrosis Factor* - Fator de necrose tumoral induzido por glicocorticóides

HA: Hemofilia A

HLA: *Human Leukocyte Antigen* - Antígeno leucocitário humano

HLA-DR: Antígeno leucocitário humano relacionado ao antígeno D

HLA-II: HLA de classe II

IA: Índice de avidéz

IFN- γ : Interferon-gamma

IgA: Imunoglobulina de classe A

IgG: Imunoglobulina de classe G

IgM: Imunoglobulina de classe M

IL: Interleucina

IMC: Índice de massa corporal

INV1: Inversão do íntron 1

INV22: Inversão do íntron 22

IQR: *Interquartile range* – Intervalo interquartil

Kb: Kilobase

kDa: Kilodalton

MCP1: *Monocyte Chemotactic Protein-1* - Proteína quimiotática de monócitos-1

MFF: Solução fixadora MaxFacsFix

MIG: *Monokine Induced by Gamma interferon* - Monocina induzida por interferon gama

mRNA: RNA mensageiro

MTP: *Minimally Treated Patients* - Pacientes minimamente tratados

NGS: *New Generation Sequencing* - Sequenciamento de nova geração

NK: Célula *Natural Killer*

OMS: Organização Mundial de Saúde

OPD: O-phenylenediamina - Orto-fenilenodiamina

Pb: Pares de bases

PBS: Tampão fosfato salina

PBS-W: Tampão fosfato salina 1X suplementado com 1% de albumina sérica bovina e Tween 20

PCR: *Polymerase Chain Reaction* – Reação em cadeia da polimerase

PE: *Phycoerythrin* – Ficoeritrina

PUPs: *Previously Untreated Patients* - Pacientes previamente não tratados

rFVIIa: Fator VII recombinante ativo

RNA: Ácido ribonucleico

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

TCR: Receptores de células T

TGF- β : *Transformer Growth Factor- β* - Fator de crescimento transformador- β

Th: Célula T auxiliar

TNF: *Tumor Necrosis Factor* - Fator de necrose tumoral

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TNFR-2: Receptor de fator de necrose tumoral-2

Tregs: Células T reguladoras

TTPA: Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado

T0: Antes de qualquer exposição ao FVIII

U: Ureia

UB: Unidade Bethesda

UI: Unidade Internacional

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Hemostasia.....	17
1.2 O papel do FVIII na coagulação.....	19
1.3 Hemofilia A.....	21
1.3.1 Herança genética da hemofilia A.....	22
1.3.2 Tratamento da hemofilia A.....	23
1.4 Anticorpos inibidores em hemofilia A.....	24
1.4.1 Diagnóstico dos inibidores de FVIII.....	24
1.4.2 Fatores de risco associados ao desenvolvimento de inibidores.....	25
1.4.3 Imunologia dos anticorpos anti-FVIII.....	27
2. JUSTIFICATIVA.....	32
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo geral.....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4. METODOLOGIA.....	34
4.1 Desenho do estudo.....	34
4.2 Seleção dos participantes e controles.....	35
4.3 Variáveis.....	35
4.4 Acompanhamento dos pacientes.....	36
4.5 Coleta e processamento de material biológico.....	36
4.6 Testes laboratoriais.....	37
4.6.1 Determinação da atividade coagulante do FVIII.....	37
4.6.2 Teste de triagem de inibidor.....	37
4.6.3 Teste de Bethesda.....	38
4.6.4 Triagem e titulação de anticorpos anti-FVIII por ELISA.....	38
4.6.5 Determinação dos índices de avidéz de anticorpos anti-FVIII.....	39
4.6.6 Dosagem de citocinas e quimiocinas plasmáticas.....	40
4.6.7 Testes moleculares.....	40
4.7 Análise estatística.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1 Artigo.....	43
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
7. REFERÊNCIAS.....	73

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hemostasia

O processo de hemostasia envolve um mecanismo complexo que é essencial para o controle de hemorragias, formação de trombos e início do reparo tecidual (BECKER, 2005). Quando ocorre lesão com extravasamento de sangue dos vasos sanguíneos, algumas reações acontecem para interromper o sangramento. O conjunto dessas reações é conhecido como coagulação sanguínea e quando ocorre de maneira desregulada, a hemostasia pode ser comprometida.

Em 1964, Macfarlane e Davie & Ratnoff propuseram o primeiro modelo de cascata de coagulação para explicar a fisiologia da coagulação do sangue (DAVIE & RATNOFF, 1964; MACFARLANE, 1964). Nesse modelo, a coagulação ocorre pela interação de duas vias: via extrínseca e via intrínseca. O processo ocorre por meio de uma série de ativações de fatores de coagulação plasmáticos, sendo a maioria enzimas que circulam em forma de zimogênios na corrente sanguínea. A forma ativada de um fator de coagulação catalisa a ativação do próximo. Poucas quantidades dos fatores de coagulação que iniciam o processo geram pequenas quantidades de trombina, que é suficiente para ativar fatores que amplificam o processo e geram fibrina (DAVIE & RATNOFF, 1964; MACFARLANE, 1964).

A via extrínseca é iniciada através da exposição do fator tecidual (FT) das células endoteliais ao sangue após lesão vascular, o que ativa o fator VII (FVII). O FT ligado ao FVII ativado catalisa a ativação do fator X (FX). A via intrínseca é iniciada pelo fator XII (FXII) que é ativado quando o sangue entra em contato com superfícies de cargas negativas (superfícies com colágeno exposto). Nestas superfícies, a calicreína, na presença do cininogênio, ativa o FXII que, por sua vez, ativa o fator XI (FXI). O FXI ativado converte o fator IX (FIX) em sua forma ativa. O FIX ativado, na presença do fator VIII (FVIII) ativado, ativa o FX. A partir da ativação do FX, o processo na via extrínseca e intrínseca é o mesmo, denominado via comum. O FX ativado ativa o fator V (FV). O FX ativado ligado ao FV ativado forma o complexo protrombinase, que leva à conversão da protrombina em trombina. A grande quantidade de trombina formada promove a conversão do fibrinogênio em fibrina que se interligará para formar polímeros, além de ativar o fator XIII (FXIII), o qual

promove a estabilização do coágulo de fibrina (BROZE, 1995). O modelo clássico da cascata de coagulação sanguínea está representado na Figura 1.

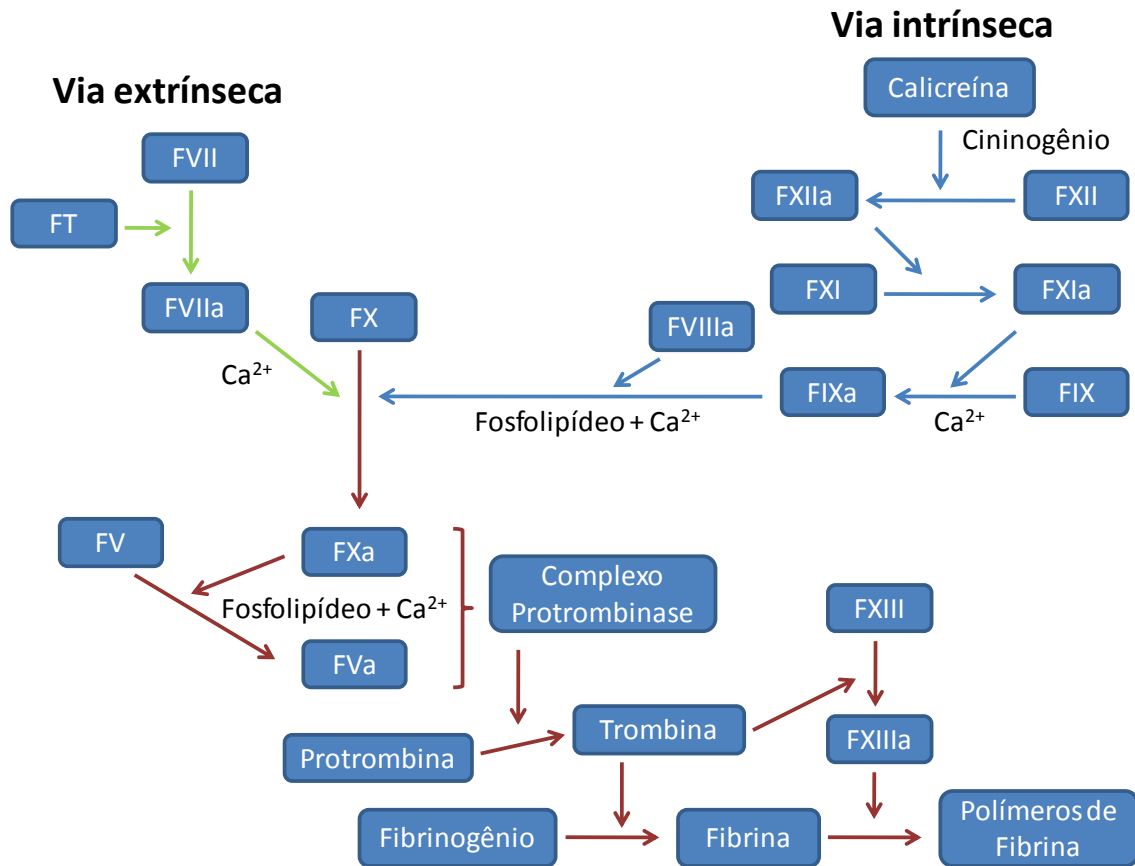


Figura 1. Modelo clássico da coagulação sanguínea.

O modelo proposto por Hoffman (2001), denominado modelo celular, conseguiu demonstrar que as vias extrínseca e intrínseca não atuam de forma independente e sim de maneira complementar (BECKER, 2005). Neste modelo, a coagulação sanguínea é dividida em três etapas: iniciação, amplificação e propagação. A etapa de iniciação ocorre no local da lesão mediada por células extravasculares que expressam FT. Na superfície dessas células, o FT ligado ao FVII ativado ativa o FIX e o FX. O FX ativado se liga ao FV formando o complexo protrombinase na superfície da célula. O FIX ativado se liga à superfície de plaquetas. Ainda nessa etapa, são geradas pequenas quantidades de trombina que iniciam a etapa de amplificação (HOFFMAN; MONROE, 2001; HOFFMAN, 2003). Na etapa de amplificação, a trombina gerada na etapa anterior ativa plaquetas que expõem seus receptores e sítios de ligação aos fatores de coagulação ativados. Além disso, o FV, FVIII e FXI são ativados. O FVIII complexado com o Fator de von Willebrand (FvW) dissocia-se. Na etapa de propagação, o FIX ativado se liga ao FVIII ativado, o FX dissocia-se do FV e ocorre a formação do complexo tenase (FVIII/FIX/FX). Todos

esses eventos ocorrem na superfície das plaquetas ativadas. A partir disso, uma significativa quantidade de trombina é formada possibilitando a formação do coágulo de fibrina (HOFFMAN; MONROE, 2001; HOFFMAN, 2003). O modelo celular da coagulação está representado na Figura 2.

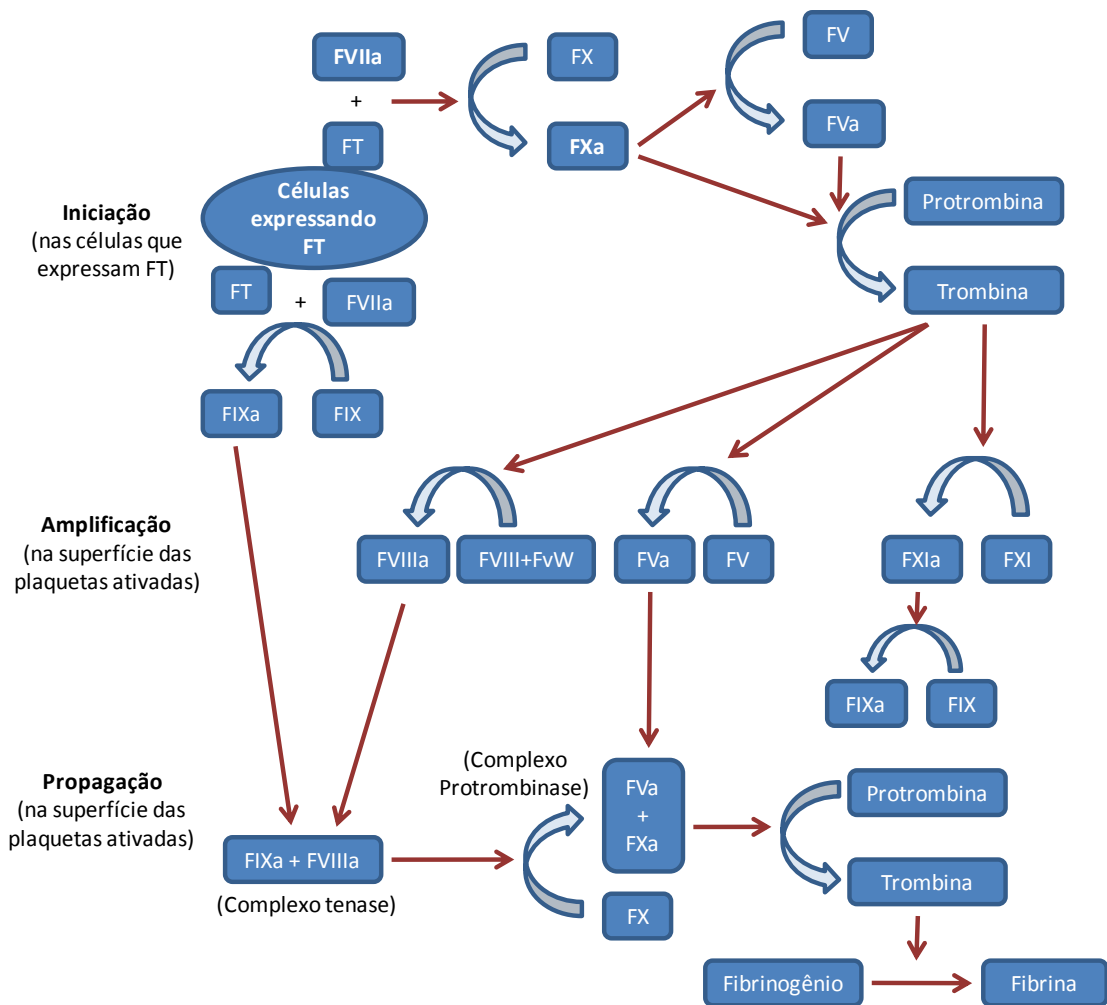


Figura 2. Modelo celular da coagulação. (FERREIRA et al., 2010. Modificado).

Considerando o modelo celular é possível perceber a importância dos fatores de coagulação, assim como do endotélio e das plaquetas e compreender as doenças causadas pela deficiência desses fatores assim como dos distúrbios das plaquetas e endotélio.

1.2 O papel do FVIII na coagulação

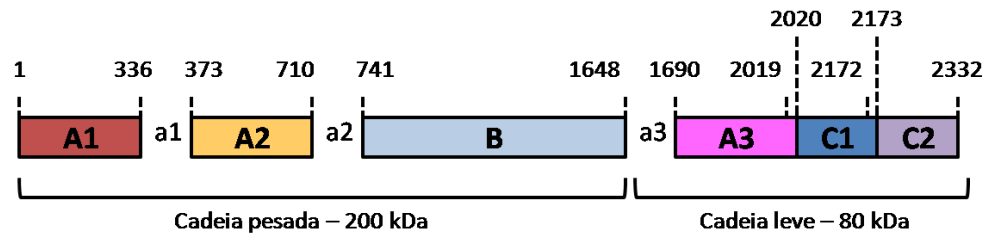
O FVIII é uma glicoproteína plasmática sintetizada principalmente em hepatócitos. O gene que codifica o FVIII está localizado no braço longo do cromossomo X na banda Xq28, possui 186 kilobases (kb), 26 éxons que variam em tamanho de 69 a 3.106

pares de bases (pb) e 25 íntrons que variam de 14 a 32 kb. Os íntrons representam cerca de 95% do gene (177 kb) (GITSCHIER et al., 1984).

O RNA mensageiro (mRNA) do gene que codifica FVIII (*F8*) tem aproximadamente 9 kb e codifica um precursor protéico com 2.351 aminoácidos, dos quais 19 correspondem a um peptídeo sinal. Após processamento protéico, uma proteína madura de 2.332 aminoácidos dispostos em 6 domínios A1-A2-B-A3-C1-C2 é gerada (LEVINSON et al., 1992; LENTING et al., 1998). As porções C-terminal dos domínios A1 e A2 e N-terminal do domínio A3, contêm resíduos carregados negativamente denominados regiões acídicas a1 (337–372), a2 (711-740) e a3 (1649-1689), respectivamente (SAENKO et al., 2002). No retículo endoplasmático, o FVIII é clivado na junção dos domínios B-A3 e em sítios adicionais dentro do domínio B, dividindo a molécula em duas porções: cadeia pesada (200 kDa) que é constituída pelos domínios A1, A2 e fragmentos do domínio B e cadeia leve (80 kDa) que é constituída pelos domínios A3, C1 e C2. As duas cadeias são associadas por um íon metal, formando um heterodímero (FAY, 2004; FANG et al., 2007). A estrutura e organização dos domínios do FVIII estão representadas na Figura 3A.

Depois de secretado na circulação sanguínea, o heterodímero inativo se liga ao FvW via domínio C2 e região a3 (PRATT et al., 1999; NGO et al., 2008). Essa ligação ao FvW previne a formação do complexo tenase (Xase) antes da ativação do FVIII, o protege da degradação pela proteína C ativada, FIX ativado e FX ativado (ANANYEVA, 2001; SAENKO et al., 2002) e auxilia no transporte do FVIII para locais de lesão endotelial. Após uma injúria vascular, o FVIII é ativado por proteólise catalisada por dois ativadores fisiológicos: trombina e FX ativado. Os principais sítios de clivagem para ativação do FVIII no processo de coagulação são nos resíduos Arg372, Arg740 e Arg1689 (BOWEN, 2002; LAVIGNE-LISSALDE et al., 2009). A ligação ao FvW facilita essas clivagens e a ativação do FVIII. A clivagem no resíduo Arg1689 resulta na remoção da região que contém o sítio de ligação ao FvW (região a3) liberando o FVIII e aumentando sua afinidade por membranas contendo fosfolipídios, incluindo as plaquetas ativadas (HILL-EUBANKS et al., 1989; SAENKO & SCANDELLA, 1997). A ativação do FVIII está representada na Figura 3B. O FVIII ativado juntamente com o FIX ativado, fosfolipídios de membrana carregados negativamente e íons de cálcio, formam o complexo tenase que ativa o FX (ANANYEVA, 2001; FAY, 2004).

A. Estrutura e organização dos domínios do FVIII



B. Ativação do FVIII

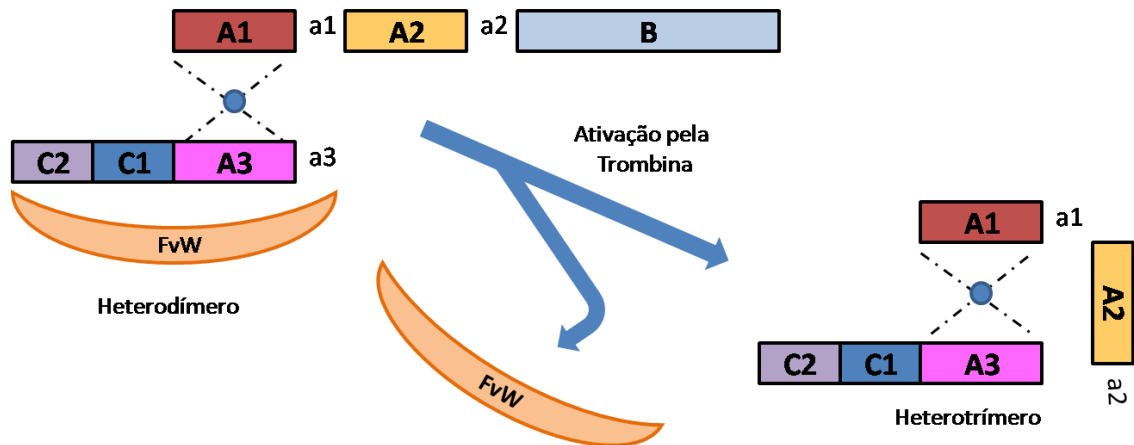


Figura 3. Estrutura primária e ativação do FVIII. **A.** Estrutura primária do fator VIII e seus domínios. O FVIII é constituído por uma cadeia pesada com 200 kDa formada pelos domínios A1, A2 e B e uma cadeia leve com 80 kDa formada pelos domínios A3, C1 e C2. **B.** A cadeia pesada e a cadeia leve do FVIII ficam associadas por um íon metal. Após ser secretado na circulação sanguínea, o FVIII se liga ao FvW. O FVIII é ativado pela trombina por clivagens nos sítios Arg372, Arg740 e Arg1689 formando um heterotrímero de duas cadeias pesadas e uma cadeia leve, e dissociando-se do FvW. (LAVIGNE-LISSALDE et al., 2009. Modificado).

1.3 Hemofilia A

A HA é uma doença hemorrágica hereditária causada pela deficiência do FVIII decorrente de mutações em *F8*. A HA é um dos distúrbios hemorrágicos mais comuns e representa cerca de 80% dos casos de hemofilia, com prevalência de 1:10.000 nascimentos masculinos. Não existe variação significativa na frequência da doença entre grupos étnicos (RIZZA & SPOONER, 1983; HEDNER, 2000).

O quadro clínico da HA é caracterizado por hemorragias de gravidade variada. As manifestações hemorrágicas mais características da doença são sangramentos articulares (hemartroses) e musculares (hematomas). A gravidade e a frequência

dos sangramentos estão diretamente relacionadas à atividade residual de FVIII no plasma. De acordo com a concentração e a atividade pró-coagulante do FVIII no plasma, a HA é classificada como grave, quando a atividade do FVIII for inferior a 1% (0,01-0,05 UI/mL) do normal, moderada quando atividade do FVIII for entre 1-5% (0,01-0,05 UI/mL) do normal e como leve quando a atividade do FVIII for superior a 5% e inferior a 40% ($>0,05$ - $<0,40$ UI/mL) do normal (ANTONARAKIS et al., 1995). Aproximadamente 50% dos pacientes com HA têm a forma grave da doença e apresentam com mais frequência sangramentos espontâneos nas articulações, nos músculos e órgãos internos, enquanto a forma moderada ocorre em cerca de 10-20% dos pacientes e é caracterizada por episódios hemorrágicos após pequenos traumas. A forma leve acomete aproximadamente 30%-40% dos pacientes e as hemorragias ocorrem somente após traumas significativos ou intervenções cirúrgicas (GRAW et al., 2005).

O diagnóstico laboratorial da HA requer a realização do teste do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA) e da determinação da atividade coagulante do FVIII (FVIII:C). O TTPA é um teste de triagem para identificar anomalias na via intrínseca da coagulação, sendo baseado na recalcificação do plasma na presença de grande quantidade de fosfolípideo e de um ativador do sistema de contato. Nas hemofilias A e B, o TTPA encontra-se prolongado. O teste de FVIII:C permite a confirmação da HA quando os níveis de FVIII:C estão abaixo de 40% e a classificação da sua gravidade. Neste teste, a amostra do paciente diluída pode encurtar o tempo de coagulação em um meio contendo plasma deficiente em FVIII, reagente para TTPA (fosfolípideo e ativador de contato) e cálcio. O resultado é representado em uma linha entre o tempo de coagulação e uma série de diluições do plasma padrão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

1.3.1 Herança genética da hemofilia A

Similarmente a todas as doenças ligadas ao cromossomo X, a HA afeta quase que exclusivamente indivíduos do sexo masculino, pois homens possuem apenas um alelo de *F8*. Diferentemente, uma vez que as mulheres possuem dois cromossomos X, estas somente manifestam a doença quando possuem os dois alelos mutados, uma situação muito rara. Assim, é mais comum que as mulheres possuam um alelo mutado, sendo então portadoras da hemofilia com 50% de probabilidade de transmitir o alelo afetado à sua prole. A atividade plasmática do FVIII das portadoras

geralmente é reduzida, mas suficiente para o funcionamento adequado da hemostasia, na maioria dos casos. Por isso, as portadoras raramente apresentam sangramento clínico (PIO et al., 2009; MAZURKIEWICZ-PISAREK et al., 2016). Em cerca de 30% dos casos, a HA origina-se a partir de mutações espontâneas (*de novo*) que podem ocorrer durante a gametogênese de um dos progenitores (mosaicismo germinativo) ou no embrião (mosaicismo somático) (SOARES et al., 2001).

1.3.2 Tratamento da hemofilia A

O tratamento da HA é baseado na reposição do FVIII deficiente através de infusões de concentrados de FVIII de forma profilática ou sob demanda. Até o início da década de 1980, os produtos disponíveis para o tratamento dos pacientes com HA eram crioprecipitado e o plasma fresco congelado. Posteriormente, surgiram os concentrados de FVIII de origem plasmática (dpFVIII), isto é, produzidos por meio do fracionamento do plasma humano, e a seguir o concentrado de FVIII de origem recombinante (rFVIII) produzido através de técnicas de engenharia genética (CASTRO et al., 2014).

A quantidade de doses, a concentração e a frequência de infusões do FVIII dependem da gravidade da hemofilia, do tipo de hemorragia e do peso corporal do paciente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Atualmente existem duas modalidades de tratamento da HA que são definidas pela periodicidade com que é realizada a reposição do fator de coagulação, podendo ser sob demanda, isto é, baseado em infusões de FVIII somente após a ocorrência de um episódio hemorrágico; ou tratamento de profilaxia que é caracterizado por reposição de FVIII de forma regular e contínua, com o objetivo de manter os níveis de FVIII suficientemente elevados para prevenir os episódios hemorrágicos. A profilaxia é recomendada pela Federação Mundial de Hemofilia (FMH), pelo Ministério da Saúde e pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para pacientes com HA grave (BERNTORP et al., 2003; FISCHER et al., 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

1.4 Anticorpos inibidores em hemofilia A

Uma das maiores complicações dos pacientes com HA é o desenvolvimento de aloanticorpos que inibem a atividade do FVIII (inibidores). A incidência acumulada de inibidores é de aproximadamente 30% nos pacientes com HA grave. Cerca de 5%-15% dos pacientes com HA moderada ou leve desenvolvem inibidores ao longo do tratamento de reposição (BAYRY et al., 2003). De forma geral, 10%-40% dos pacientes com HA desenvolvem inibidores (ENRENFORTH et al., 1992; DARBY et al., 2004).

Os inibidores de FVIII são anticorpos policlonais do tipo IgG, principalmente da subclasse IgG4, com epítomos múltiplos variáveis entre pacientes e até mesmo no mesmo paciente ao longo do tempo (CHAVES et al., 2008; LEWIS et al., 2013). Esses anticorpos inibitórios bloqueiam os epítomos funcionais do FVIII, principalmente nos sítios mais antigênicos A2, A3-C1 e C2, interferindo na atividade pró-coagulante da proteína infundida. Desta forma, o paciente passa a não responder ao tratamento com o concentrado de FVIII, podendo apresentar hemorragias que demoram mais a cessar e que são de difícil tratamento. Isso pode levar a maior morbidade com redução da qualidade de vida dos pacientes (PRESCOTT et al., 1997; LOLLAR, 2004; LEISSINGER et al., 2011; WALSH et al., 2015).

1.4.1 Diagnóstico dos inibidores de FVIII

Pacientes com inibidores passam a não responder ao tratamento com o concentrado de FVIII, podendo apresentar hemorragias que demoram mais a cessar e que são de difícil tratamento. Em alguns casos, a presença de anticorpos anti-FVIII pode ser detectada durante a avaliação laboratorial de rotina ainda que o paciente não apresente manifestações clínicas de sangramento. A presença de inibidor é confirmada por um teste de coagulação sanguínea denominado Teste de Bethesda. Uma unidade de Bethesda (UB) corresponde à diluição do plasma do paciente capaz de neutralizar 50% do FVIII em um mesmo volume de plasma normal (VERBRUGGEN et al., 1995; 2002). Os inibidores são classificados como transitórios, de alta ou baixa resposta. Títulos de inibidor persistentemente inferiores a 5 UB/mL, apesar de constante estímulo com o FVIII, são classificados como inibidores de baixa resposta. Em contraste, títulos superiores ou iguais a 5 UB/mL

em 1 ou mais ocasiões são considerados inibidores de alta resposta e podem se manter por vários meses mesmo se o paciente interromper a exposição ao FVIII (KASPER et al., 1975; LAVIGNE-LISSALDE et al., 2005). Ao longo do tempo, podem ocorrer alterações nos títulos de inibidores e o seu desaparecimento espontâneo dentro de semanas ou meses pode ocorrer, em especial com os inibidores de baixa resposta (DIMICHELE, 2000; CARAM et al., 2011). Os inibidores transitórios desaparecem ao longo da reposição de FVIII e não requerem nenhuma intervenção específica (TAGARIELLO et al., 2013).

1.4.2 Fatores de risco associados ao desenvolvimento de inibidores

Vários estudos vêm tentando investigar os complexos mecanismos fisiopatológicos que levam ao desenvolvimento de inibidores do FVIII em pacientes com HA. No entanto, as bases biológicas relacionadas ao desenvolvimento de inibidores são complexas e ainda pouco conhecidas. Achados recentes contribuíram para desvendar que os inibidores se desenvolvem a partir de um processo multifatorial envolvendo fatores genéticos e não genéticos (LILLICRAP et al., 2014; GARAGIOLA et al., 2018).

Condições associadas ao paciente tais como HA grave, raça negra, história familiar de inibidor, alta intensidade e frequência das infusões de concentrado de FVIII e uso de concentrado de FVIII recombinante são fatores de risco para o desenvolvimento de inibidores (DIMICHELE, 2002; ASTERMARK, 2015). Nos últimos anos, um dos fatores de risco mais debatidos é o tipo de concentrado de FVIII, considerando a potencial maior imunogenicidade dos rFVIII quando comparados com os pdFVIII. (WIGHT & PAISLEY, 2003; GOUDEMANT, 2006; CALVEZ et al., 2014, 2018; COLLINS et al., 2014; PEYVANDI et al., 2016).

Em 2016, Peyvandi et al. realizaram o primeiro ensaio clínico randomizado comparando diferentes classes de concentrados de FVIII (Estudo SIPPET) (PEYVANDI et al., 2016). Esse estudo mostrou que o risco de desenvolvimento de inibidores é 87% maior em pacientes tratados com rFVIII em comparação com os pdFVIII. Os resultados desse trabalho têm sido amplamente discutidos, pois outros estudos mostraram que não houve associação entre a fonte do produto e o desenvolvimento de inibidores (GOUW et al., 2007, 2013).

De acordo com alguns estudos, indivíduos afro-americanos com HA têm risco 2-3 vezes maior de desenvolver inibidores quando comparados aos indivíduos caucasianos. Suspeita-se que diferenças entre o FVIII infundido e o FVIII sintetizado por estes pacientes possam contribuir para uma maior incidência de inibidores (DIMICHELE, 2002; VIEL et al., 2009).

O tipo de mutação em *F8* é um fator de risco estabelecido para o desenvolvimento de inibidores. Pacientes com HA e mutações sem sentido, grandes deleções e inversões dos íntrons 1 (Inv1) e 22 (Inv22) possuem risco de 7-10 vezes maior de desenvolver inibidores do que pacientes com pequenas deleções/inserções e mutações *missense* (SCHAWAAB et al., 1995; GOODEVE & PEAKE, 2003; AGOSTINI et al., 2012; ASTERMARK et al., 2013). Os resultados de um estudo publicado em 2006 (OLDENBURG & PAVLOVA, 2006) demonstraram que indivíduos com mutações sem sentido, Inv22 e grandes deleções exibiram uma prevalência de inibidor de até 41%, enquanto indivíduos com mutações com troca de sentido e mutações em sítio de processamento mostraram uma prevalência de inibidor de até 10%. Além disso, grandes deleções que afetam mais de um domínio do FVIII estão associadas a um maior risco de desenvolvimento de inibidores do que deleções que afetam apenas um domínio do FVIII e mutações sem sentido na cadeia leve apresentam maior risco do que aquelas localizadas na cadeia pesada (OLDENBURG & PAVLOVA, 2006).

Possivelmente, pacientes com mutações associadas a um menor risco de desenvolvimento de inibidores sintetizam o FVIII endógeno, que, mesmo não sendo funcional, seria suficiente para conferir uma tolerância imunológica ao FVIII infundido. Por outro lado, pequenas quantidades de FVIII endógeno são sintetizadas em pacientes com mutações de maior risco de desenvolvimento de inibidores, fazendo com que o FVIII infundido seja reconhecido como uma proteína não própria, induzindo, assim, uma resposta imunológica contra a proteína exógena (GOUW et al., 2012; PANDEY et al., 2013).

Além dos fatores genéticos, variações que ocorrem naturalmente em outros genes além do *F8*, como moléculas do antígeno leucocitário humano (HLA) de classe II, por ter predisposição para apresentação de peptídeos do FVIII, e citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-10 e TNF), por estarem envolvidas na resposta

imune mediada por anticorpos, foram associadas ao maior desenvolvimento de inibidores (HAY et al., 1997; ASTERMARK, 2006a; CHAVES et al., 2010a; LOZIER et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013; SILVEIRA et al., 2015). Entretanto, os estudos realizados até o momento se basearam em desenhos transversais/caso controle e não avaliaram o efeito das infusões de FVIII sobre a resposta imune de forma prospectiva e cumulativa. Além disso, nenhum estudo avaliou os níveis de biomarcadores imunológicos em pacientes com HA durante as primeiras infusões de concentrados de FVIII.

1.4.3 Imunologia dos anticorpos anti-FVIII

A resposta imune que envolve o desenvolvimento de inibidores é clássica, na qual inicialmente o FVIII é endocitado por células apresentadoras de antígeno (APCs), como células dendríticas, macrófagos e linfócitos B, que estão localizadas nos linfonodos e baço. As APCs são ativadas através da sinalização específica contra antígenos exógenos, principalmente via receptores de manose, e dão início ao processamento intracelular que cliva o FVIII em pequenos peptídeos (8-10 aminoácidos) por proteases endo-lisossomais, os quais são carregados por moléculas de HLA de classe II. O complexo peptídeo-HLA-II é exposto na superfície das APCs e apresentados aos receptores de células T (TCR) de células T CD4⁺, resultando em sua ativação e proliferação em células T efetoras e de memória (RICK et al., 2003).

Sinais co-estimulatórios são proporcionados pela ligação de células B (CD80 e CD86) ao CD28 para ativar completamente os linfócitos T e estimular a liberação de citocinas (WATERS & LILLICRAP, 2009). A ativação de células T do tipo 1 induzem a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como interferon-gama (INF- γ), interleucina-2 (IL-2) e fator de necrose tumoral (TNF), que favorecem a ativação das APCs e estimulam células B a se diferenciarem em células produtoras de anticorpos que se ligam ao complemento (IgG1 e IgG2) e células B de memória (MURPHY, 1998; LOLLAR, 2004). Por outro lado, as células T do tipo 2 produzem citocinas anti-inflamatórias/reguladoras, como interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10), que regulam a ativação das APCs e das células do tipo 1, reduzindo a intensidade da resposta imune, além de estimularem a diferenciação de células B em células produtoras de anticorpos que não se ligam ao complemento (IgG4) e ainda células B de memória. Embora os inibidores de FVIII sejam principalmente da subclasse IgG4,

as subclasses IgG1 e IgG2 também estão usualmente presentes (REDING et al., 2002, 2003; LOLLAR, 2004; CHAVES et al., 2008).

Isotipos como IgM e IgA também podem ser observados, mas principalmente em indivíduos com hemofilia adquirida, uma doença autoimune (TIEDE et al., 2016). A ativação das células T é regulada negativamente pela ligação competitiva do antígeno 4 dos linfócitos T citotóxicos (CTLA4) às moléculas B7 das APCs (LOLLAR, 2004; LAI & LILLICRAP, 2017). Há possibilidade de existir uma resposta imune contra o FVIII independente de células T, associada principalmente à formação de anticorpos não neutralizantes e/ou de baixa afinidade (PORDES et al., 2011). A ativação da resposta imune pelo FVIII exógeno e formação de anticorpos inibidores está representada na Figura 4.

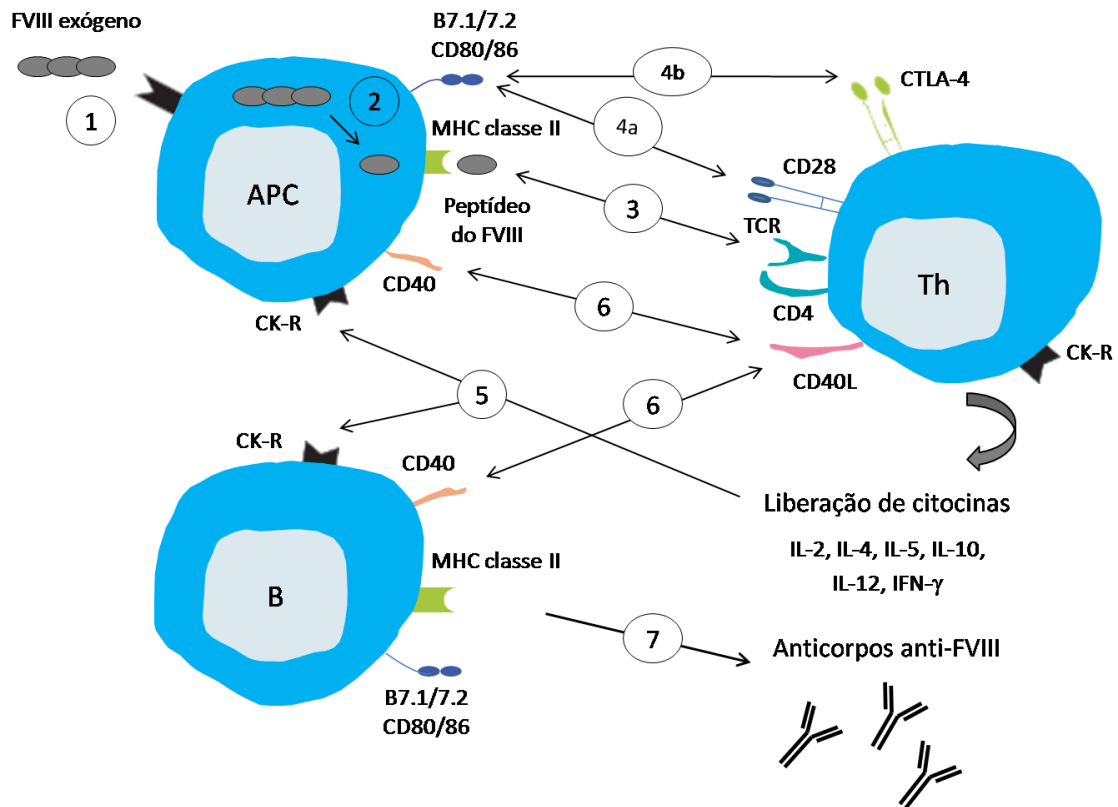


Figura 4. Ativação da resposta imune pelo FVIII exógeno e formação de anticorpos inibidores. O FVIII exógeno liga-se à APC (1). Após endocitose, o FVIII é clivado em pequenos peptídeos (2). Esses peptídeos são carregados por MHC-II. O complexo peptídeo-HLA-II é exposto na superfície da APC e apresentados aos receptores de células T (TCR) de células T CD4⁺ (3). Sinais coestimulatórios são proporcionados pela ligação de moléculas da APC (CD80 e CD86) ao CD28 (4a) para ativar completamente os linfócitos T e estimular a liberação de citocinas (5). A ligação dessas citocinas aos receptores correspondentes (CK-R) estimula genes da resposta imune e moléculas coestimulatórias na superfície de células B e T (6). A ação aumentada de citocinas e moléculas coestimulatórias, incluindo interação entre CD40 e CD40L, induz a proliferação de células B específicas contra o FVIII a se diferenciarem e produzirem anticorpos anti FVIII (7). A ativação das células T é regulada negativamente pela ligação competitiva do CTLA4 às moléculas B7 das APCs (4b). (ASTERMARK, 2006b Modificado).

Alguns estudos sugerem que o tratamento com infusões repetidas de concentrado de FVIII possa alterar a resposta imune, podendo contribuir para a fisiopatologia dos inibidores (HU et al., 2007; CHAVES et al., 2010b; OLIVEIRA et al., 2013). Esses estudos indicam a participação de citocinas anti-inflamatórias/reguladoras, principalmente IL-4, IL-5 e IL-10, no desenvolvimento de inibidores, bem como a baixa produção de inibidores na presença de moléculas pró-inflamatórias (TNF, IFN- γ e IL-2). Por outro lado, um estudo recente (SUN et al., 2018) mostrou que citocinas pró-inflamatórias foram significativamente elevadas em camundongos com HA com

inibidores anti-FVIII em comparação com camundongos com HA sem inibidores. Além disso, foram detectados baixos níveis plasmáticos de citocinas anti-inflamatórias nos camundongos com inibidores, sugerindo que citocinas anti-inflamatórias diminuídas e citocinas pró-inflamatórias aumentadas criam um ambiente favorável à resposta imune para o desenvolvimento de anticorpos contra o FVIII (SUN et al., 2018).

Em artigo recente, nosso grupo investigou o perfil imunológico de pacientes com hemofilia previamente não tratados (PUPs, da sigla em inglês, *previously untreated patients*) em comparação com meninos saudáveis. Os PUPs apresentaram níveis significativamente maiores de IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A mostrando que esses pacientes apresentam um perfil imunológico distinto mesmo anteriormente à infusão de FVIII, caracterizado por um proeminente estado pró-inflamatório regulado por IL-4 e IL-10. Os autores hipotetizaram que algumas citocinas e quimiocinas são secretadas em resposta a um processo inflamatório inicial provavelmente estimulado por sangramentos subclínicos que ocorrem em PUPs com HA (JARDIM et al., 2017).

A maioria dos estudos publicados relata que as citocinas desempenham um papel importante na resposta imune envolvida no desenvolvimento de inibidores (CHAVES et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2013). No entanto, as quimiocinas têm sido menos exploradas nesse cenário (JARDIM et al., 2017; SUN et al., 2018). As quimiocinas atuam como agentes quimiotáticos de leucócitos circulantes, promovendo sua migração para locais de inflamação ou lesão (CHARO & RANSOHOFF, 2006). CXCL8 está envolvido na inflamação, fibrose, angiogênese, tumorigênese e é um quimiotático potente de neutrófilos (HUBER, et al., 1991; RUSSO et al., 2014). Além disso, atua como uma importante quimiocina no cenário de infecção e lesão vascular (KOCH et al., 1992). CXCL9 e CXCL10 estão envolvidas no recrutamento de células T efetoras para locais de inflamação (LUSTER, 1998) enquanto CCL2 e CCL5 medeiam migração de monócitos e macrófagos e sua infiltração em locais de inflamação (DESHMANE et al., 2009). Quimiocinas têm sido implicadas em uma ampla gama de doenças com componentes inflamatórios proeminentes. Por exemplo, níveis elevados de quimiocinas CC, particularmente CCL2 e CCL5, nas articulações de pacientes com artrite reumatóide coincidem com o recrutamento de monócitos e células T para os tecidos sinoviais (CHARO & RANSOHOFF, 2006). Como o CXCL8 é um componente crítico de processos mediados por inflamação, a

superexpressão de CXCL8 e seus receptores tem sido implicada em várias doenças mediadas por inflamação que incluem fibrose cística, doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, psoríase, artrite reumatóide e doenças inflamatórias intestinais (HA et al., 2017).

As células T reguladoras (Tregs) parecem desempenhar um papel crucial para evitar o processo de formação de inibidores (CAO et al., 2009). As Tregs formam uma subpopulação de linfócitos T capazes de suprimir as células T efetoras a partir de vários mecanismos como a supressão da proliferação e produção de citocinas por células T efetoras e impedimento da diferenciação de células T CD8⁺ em células totalmente funcionais (MELO & CARVALHO, 2009). Além disso, as Tregs podem suprimir mecanismos dependentes do contato celular envolvendo APCs ou inibir a secreção de citocinas (CAO et al., 2009). Vários subconjuntos de Tregs com atividade supressora foram descritos, incluindo Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, células Tr1 produtoras de IL-10, células Th3 produtoras de fator de crescimento transformador- β (TGF- β), Treg CD8⁺, células NK-T, células CD4⁻CD8⁻ e células T $\gamma\delta$ (CAO et al., 2009). Em particular, as células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ expressam CD25, CTLA-4, receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticóides (GITR), receptor de fator de necrose tumoral-2 (TNFR-2) e antígeno leucocitário humano relacionado ao antígeno D (HLA-DR) e se originam durante o desenvolvimento de células T tímicas (MELO & CARVALHO, 2009). Entretanto, essas células também podem ser induzidas a partir de células T convencionais na periferia (CAO et al., 2009; MELO & CARVALHO, 2009).

Um estudo recente sugeriu que as células B localizadas na zona marginal do baço podem ter um papel importante no início do desenvolvimento de inibidores (ZERRA et al., 2017). Os autores mostraram que o FVIII se localizou na zona marginal do baço de camundongos com HA logo após a injeção, na mesma região de concentração das células B. Os resultados mostraram que a remoção das células B da zona marginal impede completamente a formação de inibidores após a infusão de FVIII em modelo animal (ZERRA et al., 2017).

2. JUSTIFICATIVA

A HA é a coagulopatia mais frequente ligada ao cromossomo X. Dentre as complicações clínicas associadas à doença, o desenvolvimento de inibidores contra o FVIII é, sem dúvida, a mais temida e desafiadora, acometendo aproximadamente 30% dos pacientes com a forma grave da doença. Pacientes com HA que desenvolvem inibidores apresentam sangramento de difícil controle com o concentrado de FVIII e passam a requerer agentes hemostáticos mais onerosos e menos eficientes. Os principais fatores de risco conhecidos para o desenvolvimento de inibidores em HA são a presença de história familiar de inibidor, o tipo de mutação de *F8* e a intensidade das infusões de FVIII. Entretanto, não se conhece o motivo pelo qual infusões frequentes e intensivas de FVIII levariam ao desenvolvimento de inibidor. Assim, nós hipotetizamos que as infusões de FVIII poderiam levar a um desequilíbrio do sistema imune que poderia estimular o desenvolvimento de inibidores. Para testar esta hipótese, nós propusemos avaliar os efeitos das infusões de concentrado de FVIII sobre biomarcadores do sistema imunológico em pacientes com HA durante o tratamento de reposição até pelo menos 75 DE ou ao desenvolvimento de inibidor.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito das infusões de fator VIII sobre biomarcadores imunológicos em crianças com HA congênita.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o perfil isotípico e de subclasses de anticorpos anti-FVIII em amostras de crianças com HA antes da primeira infusão e durante o tratamento com concentrado de FVIII.
2. Avaliar o perfil isotípico e de subclasses de anticorpos anti-FVIII em amostras de crianças com HA que não desenvolveram inibidores em comparação com os que desenvolveram.
3. Avaliar o perfil de citocinas e quimiocinas em amostras de crianças com HA antes da primeira infusão e durante o tratamento com concentrado de FVIII.
4. Avaliar o perfil de citocinas e quimiocinas em amostras de crianças com HA que não desenvolveram inibidores em comparação com os que desenvolveram.

4. METODOLOGIA

4.1 Desenho do estudo

Este é um estudo de coorte, prospectivo, que tem como objetivo avaliar o efeito das infusões de FVIII sobre biomarcadores imunológicos em crianças com HA acompanhados desde o diagnóstico. Este estudo é um subprojeto do Estudo HEMFIL, um estudo de coorte, prospectivo, que tem como objetivo avaliar fatores clínicos, imunológicos e genéticos relacionados ao desenvolvimento de inibidores em hemofilia. O delineamento do estudo está representado na Figura 5.

O nome Estudo HEMFIL deu-se em homenagem ao cartunista Henfil, que, junto com mais dois irmãos, tinha hemofilia A e faleceu em decorrência de complicações da doença. Para tal uso, obteve-se aprovação do seu filho (Ivam Cosenza de Souza), que dirige a Fundação Henfil. Ele permitiu o uso da figura da grauna como logo do Estudo HEMFIL, que foi desenhada por um ilustrador especificamente para o estudo.

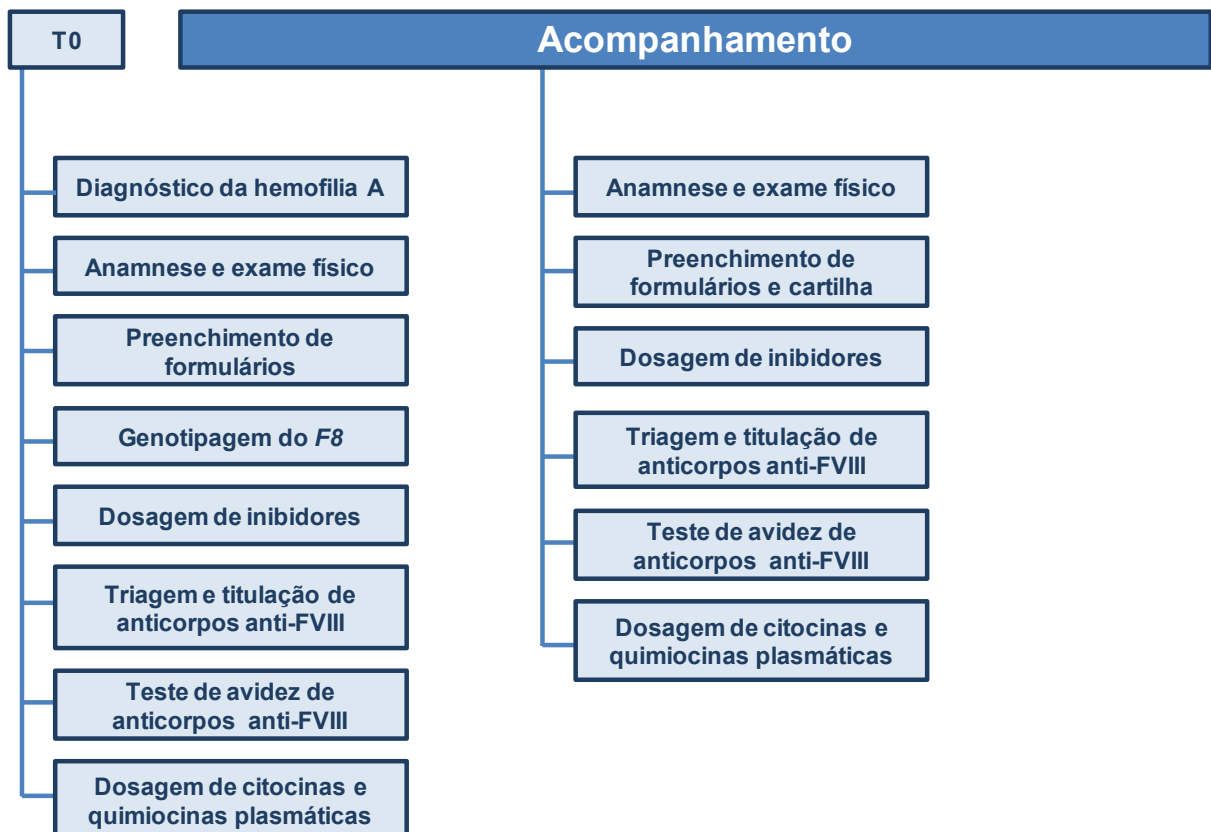


Figura 5. Delineamento do estudo.

4.2 Seleção dos participantes e controles

Os participantes incluídos no estudo foram crianças do sexo masculino com HA diagnosticados com as formas grave ou moderadamente grave da doença (FVIII:C < 2%) atendidos em cinco centros de tratamento de hemofilia no Brasil (Hemocentro de Belo Horizonte, Fundação HEMOMINAS em Minas Gerais; HEMOES no Espírito Santo; HEMORIO no Rio de Janeiro; HEMEPAR no Paraná e HEMOSC em Santa Catarina). Os pacientes foram incluídos de forma consecutiva pelos médicos assistentes de cada um dos centros de hemofilia, logo após o diagnóstico de HA ser confirmado, sempre que possível antes da primeira infusão de qualquer hemocomponente/hemoderivado (pacientes previamente não tratados [PUPs, da sigla em inglês, *previously untreated patients*] ou até no máximo cinco DE (pacientes minimamente tratados [MTP, da sigla em inglês, *Minimally treated patients*]).

Para o grupo-controle, foram incluídas 20 crianças do sexo masculino, saudáveis, brasileiras, na mesma faixa etária que os pacientes incluídos no projeto (mediana, 11,5 meses; *Interquartile range* [IQR] 7,5-13,0 meses). 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 intercorrências passadas dignas de nota.

Todos os pais/responsáveis pelos pacientes foram informados sobre os objetivos do projeto e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 11). Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética institucionais e obteve o número CAAE 05648412.2.0000.5118 (Anexo 1).

4.3 Variáveis

Após inclusão, foram coletados dados sócio-demográficos, clínicos e laboratoriais dos pacientes através do preenchimento de formulários padronizados (Anexos 2-5). Além disso, os pacientes realizaram a primeira avaliação clínica, para realização da anamnese e exame físico.

Resumidamente, foram coletadas as seguintes variáveis na inclusão do estudo: data de nascimento; origem étnica (auto-definição); local do nascimento; peso; atividade residual do FVIII:C; grupo sanguíneo; tipo de parto; data do diagnóstico da hemofilia;

motivo do diagnóstico; história familiar de hemofilia; história familiar de inibidor; tratamento de infecções; alergias; vacinação.

4.4 Acompanhamento dos pacientes

Os pacientes foram acompanhados, a partir do diagnóstico, pelos médicos dos centros participantes através de avaliação clínica periódica com intervalos de no máximo 60 dias, incluindo a realização de anamnese e exame físico, além do preenchimento dos formulários de acompanhamento padronizados (Anexos 6-10).

Os participantes do estudo receberam uma cartilha de acompanhamento que foi preenchida pelo familiar responsável nos períodos de intervalo entre as consultas (Anexo 13). Esta cartilha é trazida ao centro participante em todas as avaliações bimensais. Resumidamente, as seguintes variáveis foram coletadas a cada 60 dias: peso; alergias; vacinação; tratamento de infecções; tratamento com fatores de coagulação; tipo de tratamento; dose por dia (se profilaxia); nome do produto; sangramentos e tratamento instituído; dosagem de inibidores; internações e cirurgias; medicações utilizadas; número acumulado de DE.

4.5 Coleta e processamento de material biológico

No momento do diagnóstico (T0), foram coletadas de cada paciente três amostras de 5 mL de sangue total em tubos contendo citrato de sódio 3,2%. Essas amostras foram utilizadas para determinação do FVIII:C, pesquisa de inibidor e análise do perfil imunológico. Uma amostra adicional de 5 mL de sangue total foi coletada em tubo contendo EDTA. Esta foi utilizada para extração de DNA e realização dos testes genéticos para determinação da mutação associada à HA. As amostras dos controles foram coletadas no Ambulatório de Pediatria do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Para separação do plasma, o sangue total foi centrifugado a 3.500 rpm por 15 minutos a 18°C. O plasma foi aliquoteado imediatamente em tubos de polipropileno (tipo eppendorf) e congelado a -80°C até a realização dos testes laboratoriais. As amostras de plasma coletadas nos Hemocentros do Espírito Santo, Rio de Janeiro e Santa Catarina foram transportadas para o laboratório do Serviço de Pesquisa da

Fundação HEMOMINAS por *courier* em gelo seco e armazenadas a -80°C até a realização dos testes laboratoriais.

Parte das amostras de plasma dos pacientes que haviam sido coletadas em diferentes estágios do tratamento para dosagem de inibidor a cada 60 dias foram utilizadas neste estudo. As amostras foram divididas em quatro estratos de dias de exposição (DE) ao FVIII: antes de qualquer exposição (T0); 1-20 DE, 21-75 DE e acima de 75 DE ao FVIII. Considera-se como um DE o dia em que o paciente foi exposto ao FVIII, ou seja, o dia em que o paciente recebeu infusão de FVIII, independente da quantidade de doses no mesmo dia e da concentração utilizada.

4.6 Testes laboratoriais

4.6.1 Determinação da atividade coagulante do FVIII

Para definição do tipo de hemofilia e classificação da gravidade da doença, o teste de FVIII:C foi realizado para cada paciente em cada um dos centros participantes do projeto. O plasma foi diluído na proporção de 1:5 com Tampão Imidazol (0,1 mL de plasma + 0,4 mL de tampão). A diluição do plasma foi suplementada com 0,1 mL de plasma deficiente em fator VIII e foram adicionados 0,1 mL de cefalina. A mistura foi incubada a 37°C por 3 minutos. Foi adicionado 0,1 mL de cloreto de cálcio (0,025 M) e registrado o tempo de formação do coágulo em coagulômetro. O resultado foi fornecido em tempo e calculado em atividade (%) a partir de uma curva de calibração realizada com amostras controles (*pool* de plasma de controles normais). Os testes foram realizados em duplicata, sendo o resultado final a média entre as duas dosagens.

4.6.2 Teste de triagem de inibidor

O teste de triagem de inibidor é rotineiramente realizado nos laboratórios de coagulação dos centros de hemofilia participantes como método de rastreamento para a presença de inibidores. O teste se baseia na mistura do plasma do paciente com um *pool* de plasmas normais e incubação dessa mistura por 2 horas a 37°C para investigar a presença de inibidores. O que se espera é verificar um aumento no tempo de formação de coágulo do *pool* de plasmas normais caso o plasma do paciente contenha inibidores. Mediante positividade deste teste deve ser realizada a titulação dos inibidores através do teste de Bethesda, descrito em 4.6.3.

4.6.3 Teste de Bethesda

A titulação dos inibidores foi feita por meio do teste de Bethesda em cada um dos centros participantes do projeto e sua positividade confirmada em um segundo teste, com intervalo de duas a quatro semanas. Para a realização do teste, as amostras de plasma dos pacientes foram preparadas em uma série de diluições e incubadas a 37°C por 2 horas junto a um *pool* de plasmas de indivíduos sem hemofilia, com concentrações normais de FVIII plasmático (*pool* de plasmas normais). Como controle foi feita uma solução contendo plasma deficiente de FVIII e *pool* de plasmas normais. Após a incubação, dosou-se o FVIII:C residual nas amostras e na solução controle. Para o cálculo da atividade de inibidor, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{FVIII residual da amostra do paciente}}{\text{FVIII residual da solução controle}} \times 100$$

4.6.4 Triagem de anticorpos anti-FVIII por ELISA

Todas as amostras de plasma selecionadas para o estudo foram utilizadas em testes de triagem por ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) para verificação da presença de anticorpos anti-FVIII. Para realização do protocolo, placas de 96 poços (Invitrogen™ Nunc MaxiSorp™, Thermo Scientific™; Massachusetts, EUA) foram sensibilizadas *overnight* a 4°C com 100 µL de FVIII recombinante (ADVATE® Alfa octocogúe, Baxter; Lexington, EUA) diluído em PBS 1X (0,1 UI/poço). As placas foram lavadas três vezes com 100 µL/poço de solução de lavagem (PBS 1X 1%, Tween 20 - PBS-W) e bloqueadas por 1 hora a 37°C com 200 µL/poço de solução de bloqueio (PBS 1X e 1% de albumina sérica bovina). Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com 100 µL/poço de PBS-W. Foram adicionados 100 µL/poço das amostras de plasma dos pacientes diluídas 1:40 em solução de bloqueio e incubadas por 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS-W e a reação foi finalizada com 100 µL/poço dos seguintes anticorpos diluídos em solução de bloqueio: IgM-Biotina de cabra anti-humano, específico da cadeia µ (B1265, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), diluído 1:40.000; IgG1-HRP monoclonal de rato anti-humano, HP6188 (M1328, Sanquin, Holanda), diluído 1:10.000; IgG3-Biotina monoclonal de rato anti-humano, HP6050 (B3523, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), diluído 1:1.000 e IgG4-Biotina monoclonal de rato

anti-humano, HP6025 (B3648, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), diluído 1:3.000. Os experimentos foram realizados separadamente para cada subclasse de anticorpos (IgM, IgG1, IgG3 e IgG4). As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C e lavadas três vezes com 100 µL/poço de PBS-W. Foram adicionados 100 µL/poço de Streptavidina marcada com peroxidase (Sigma–Aldrich) diluída em solução de bloqueio (1:5.000) e a placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. Após cinco lavagens com 100 µL/poço de PBS-W, a revelação foi realizada com 100 µL/poço de solução de OPD (o-phenylenediamina), sendo a placa incubada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 30 minutos. A absorvância foi mensurada a 492nm em leitor de ELISA após adição de 50 µL/poço de H₂SO₄ 1M (Sigma–Aldrich). Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados emitidos como média dos dois testes.

4.6.5 Determinação dos índices de avidéz de anticorpos anti-FVIII

As amostras de plasma dos pacientes que tiveram resultados de densidade óptica (DO) maior que a média da DO dos controles mais três desvios-padrão (DP) foram utilizadas em um teste para determinar a intensidade com que anticorpos IgG e IgM permanecem ligados ao antígeno (ELISA-Avidéz). Nesta técnica, foi utilizada uma solução de ureia 6 M para causar o rompimento das interações entre anticorpos e antígenos. A técnica de ELISA-Avidéz foi realizada de acordo com a técnica de ELISA convencional descrita anteriormente, exceto pela primeira lavagem após a incubação com as amostras de plasma, na qual os poços, em duplicata, foram submetidos a uma incubação com uma solução de ureia 6 M em PBS 1X por 10 minutos, enquanto outra duplicata das mesmas amostras foi incubada com PBS-W por 10 minutos.

Para a avaliação dos índices de avidéz das imunoglobulinas, os resultados foram expressos como Índice de Avidéz (IA) e calculados como a razão entre os valores da DO obtidos das amostras tratadas com ureia (U+) e das amostras não tratadas com ureia (U-), seguindo a fórmula: $IA (\%) = [DO(U+) / DO(U-)] \times 100$. Os valores de IA <30% foram considerados de baixa avidéz, IA entre 30% e 60% de avidéz intermediária e IA >60% de alta avidéz (HEDMAN; ROUSSEAU, 1989).

4.6.6 Dosagem de citocinas e quimiocinas plasmáticas

As amostras de plasma foram descongeladas em banho-maria por 5 minutos a 37°C e centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm para separação do plasma pobre em plaquetas. A dosagem de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, INF- γ , TNF e IL-17A) e quimiocinas (CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10) por citometria de fluxo utilizou kits comerciais (CBA – Cytometric Bead Array – Becton, Dickinson and Company - BD/Pharmingen, San Jose, EUA), foram registradas em pg/mL e os experimentos foram feitos em duplicata, de acordo com as especificações do fabricante. Os dados foram analisados usando o software FCAP v1.0.1 (BD Biosciences, Franklin Lakes, Estados Unidos).

O CBA é um método de captura de um analito solúvel através de anticorpos específicos conjugados a *beads*. O Kit possui um reagente de detecção, composto por ficoeritrina (PE) conjugada com anticorpos que é utilizado para identificação do analito ligado as *beads*. As citocinas e quimiocinas plasmáticas específicas presentes na amostra do paciente se ligam às *beads* formando um complexo bead-analito-reagente de detecção, que é dosado através de citometria de fluxo. A concentração do analito é medida a partir da intensidade da fluorescência gerada, comparando-se a uma curva padrão sendo a fluorescência detectada proporcional à concentração do analito.

4.6.7 Testes moleculares

Os pacientes incluídos no estudo foram avaliados para a presença das inversões dos introns 1 (Inv1) e 22 (Inv22) de *F8*. Uma região de 9,5 kb do íntron 22 (Int22h1) encontra-se presente duas vezes próxima à região telomérica (Int22h2 e Int22h3). A recombinação entre a região Int22h1 e as regiões extragênicas homólogas Int22h2 ou Int22h3 resultarão, respectivamente, nas inv22 do tipo 1 e tipo 2.

As análises das Inv1 e Inv22 foram realizadas nas amostras coletadas em tubos contendo EDTA em T0. Primeiramente, foi feita a extração de DNA genômico utilizando kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), com metodologia baseada em coluna de sílica. Para realização da técnica de PCR inversa para diagnóstico da Inv22, 10 μ L de DNA (100 ng/ μ L) foram digeridos com

10 U/ μ g de enzima Bcl I (Invitrogen, Calif3rnia, EUA) a 55°C por 2 horas. O produto da digest3o foi purificado com a mistura de fenol e clorof3rmio/3lcool isoam3lico (v/v de fenol saturado [pH8,0] e clorof3rmio dilu3do em 3lcool isoam3lico na propor3o 24:1). Em seguida, 50 μ L do produto purificado foram incubados na presen3a de 5 U/ μ L da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen, Calif3rnia, EUA) a 15°C, *overnight*, para gera3o de mol3culas de DNA circulares. O produto da liga3o foi purificado novamente com a mistura de fenol e clorof3rmio/3lcool isoam3lico e, em seguida, duas rea3o3es de amplifica3o por PCR realizadas seguindo o mesmo protocolo, com altera3o apenas na combina3o de oligonucleot3deos utilizada (Tabela 3): uma para o teste diagn3stico e, a outra, para teste complementar. Resumidamente, 6 μ L do produto purificado foram misturados a tamp3o de rea3o 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 100 μ M de cada dNTP, 3 U de GoTaq DNA polimerase (Promega, Wisconsin, EUA) e 10 μ M de cada um dos oligonucleot3deos em um volume final de 25 μ L. As duas rea3o3es foram amplificadas em termociclador com o mesmo perfil t3rmico: 35 ciclos de 96°C por 30 segundos, 56°C por 1 minuto e 72°C por 90 segundos. Os produtos resultantes da amplifica3o foram visualizados em gel de agarose 2%.

Tabela 1. Oligonucleot3deos utilizados na rea3o da Inv22

Identifica3o	Sequ3ncia (5'-3')
<i>ID</i>	ACATACGGTTTAGTCACAAG
<i>IU</i>	CCTTTCAACTCCATCTCCAT
<i>ED</i>	ICCAGTCACTTAGGCTCAG
<i>2U</i>	ACGTGTCTTTTGGAGAAGTC
<i>3U</i>	CTCACATTGTGTTCTTGTAGTC

As rea3o3es de PCR para an3lise da Inv1 foram realizadas com 300 ng/ μ L de DNA gen3mico, misturados a 2,5 μ L de tamp3o 1X; 4 mM MgCl₂; 5% DMSO; 0,5 mM de cada DNTP; 1,25 U da enzima Taq polimerase e 10 μ M de cada oligonucleot3deo, sendo: *Int1h-1* (oligonucleot3deos 9F + 9cR + int1h-2F); *Int1h-2* (oligonucleot3deos int1h-2F + int1h-2R + 9F) (Tabela 4).

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados na reação da Inv1

Identificação	Sequencia (5'-3')
<i>9cR</i>	CTAGCTTGAGCTCCCTGTGG
<i>9F</i>	GTTGTTGGGAATGGTTACGG
<i>Int1h-2F</i>	GGCAGGGATCTTGTTGGTAAA
<i>Int1h-2R</i>	TGGGTGATATAAGCTGCTGAGCTA

O sequenciamento completo de *F8* é imprescindível para identificar a alteração genética associada a HA naqueles pacientes que não apresentam as inversões. Isso será possível com a cobertura completa de toda a região exônica de *F8*, incluída em um painel customizado, junto a outros genes de interesse do estudo, para avaliação através da técnica de sequenciamento de nova geração (NGS) (procedimento em andamento). Será utilizada a ferramenta *Design Studio* da empresa Illumina (Califórnia, EUA) para a customização das regiões de interesse e seleção do painel de enriquecimento para a construção das bibliotecas com *AmpliSeq Custom DNA Panel for Illumina*, de acordo com as especificações do fabricante. Para gerar sequências com cobertura média de 300X, será utilizado o sequenciador *Miseq*. As análises dos dados genômicos obtidos serão executadas utilizando as ferramentas disponíveis no *BaseSpace Suite* da Illumina.

4.7 Análise estatística

O número de eventos e os respectivos percentuais foram calculados para as variáveis categóricas e a mediana com intervalo interquartil (IQR) para as variáveis contínuas. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Mann-Whitney bilateral. Análises de correlação foram realizadas usando o teste de correlação de Spearman. Os dados incluídos nas figuras apresentaram coeficientes de correlação acima de 0,5. Gráficos de radar foram construídos usando a frequência de pacientes com níveis de citocinas e quimiocinas acima da mediana. O ponto de corte entre os níveis desses analitos foi definido pelo cálculo da mediana a partir dos valores obtidos para cada citocina e quimiocina avaliada em cada estrato. A comparação das frequências foi feita pelo teste exato de Fisher. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $P < 0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando o *software* GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Artigo

EFFECT OF FACTOR VIII INFUSIONS ON IMMUNOLOGICAL BIOMARKERS IN CHILDREN WITH HEMOPHILIA A: RESULTS FROM THE HEMFIL STUDY

Larissa Maira Moura de Oliveira¹, Daniel Gonçalves Chaves², Letícia Lemos Jardim¹, Marcio Portugal Santana², Mônica Hermida Cerqueira³, Claudia Santos Lorenzato⁴, Vivian Karla Brognoli Franco⁵, Luciana Werneck Zuccherato^{1,6}, Suely Meireles Rezende¹

¹Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

²Fundação Hemominas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

³Instituto de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (HEMORIO), Rio de Janeiro, Brazil.

⁴Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR), Curitiba, Brazil.

⁵Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC), Florianópolis, Brazil.

⁶Instituto Mário Penna, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Running title: Factor VIII infusions and immunological biomarkers

Word count:

Abstract:

Manuscript:

Correspondence:

Suely Meireles Rezende

Faculty of Medicine

Universidade Federal de Minas Gerais

Avenida Alfredo Balena, 190, room 255

Belo Horizonte - MG - ZIP. 30130-100

Phone/FAX: +55 31 34099933/45

E-mail: suely.rezende@uol.com.br/srezende@medicina.ufmg.br

SUMMARY

Hemophilia A (HA) is an inherited bleeding disorder caused by factor (F)VIII deficiency. Its treatment is based on the replacement of deficient FVIII either prophylactically or on demand. One of the major complications of HA is the development of alloantibodies that inhibit FVIII activity (inhibitors). Recent studies suggest that treatment with repeated infusions of FVIII concentrate may alter the immune response and, therefore, contributes to inhibitor development. The objective of this study was to investigate the effect of infusions of FVIII concentrate on immunological biomarkers of patients with congenital HA (PHA). Most (80.3%) PHA were included at diagnosis and before any FVIII infusion (PUPS; previously untreated patients). Socio-demographic, clinical and laboratory variables were collected. Plasma samples were collected at enrollment (T0) and every 5-10 exposure days (ED) to FVIII until at least 75 ED (T1/INB-) or inhibitor development (T1/INB+). Anti-FVIII antibodies (IgM, IgG1, IgG3 and IgG4) were tested by ELISA as well as a panel of chemokines (CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 and CXCL10) and cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF and IL-17A). Descriptive statistical analysis of variables and Spearman correlation between biomarkers were performed. A total of 71 patients with severe (FVIII <1%; n=69) and moderately severe (FVIII 1%-2%; n=2) HA were included. The median age was 10 months (interquartile range [IQR], 6.0-14.0). At T0, there was no difference in the cytokine and chemokine profile between INB- and INB+. The levels of CCL2, CXCL9 and CXCL10 were significantly lower (p=0.02, p=0.0001 and p=0.02, respectively) in the INB+ group when compared with the INB- in the 1-20 ED stratum. Anti-FVIII IgG4 levels in the INB+ group were significantly higher in the strata 1-20 ED (p=0.001) and 21-75 ED (p=0.01) when compared with T0. Anti-FVIII IgG4 in the INB+ group was significantly higher in the 1-20 ED stratum (p=0.01) when compared with INB-. IgG1 showed no significant difference between the two groups nor between the different strata, but there was a trend of increased levels in the INB+ group in the 1-20 DE stratum (p=0.08). We conclude that infusion of FVIII was associated with increased levels of pro-inflammatory cytokines, chemokines, anti-FVIII IgG1 and IgG4 in INB+ patients. These results suggest that FVIII acts by selectively modulating the immune system. Chemokines (CCL2, CXCL9 and CXCL10) are the key elements that differentiate the INB- and INB+ groups during the first exposures to FVIII.

Keywords: Hemophilia A, Factor VIII, inhibitors, immune response, immunological biomarkers.

INTRODUCTION

Hemophilia A (HA) is an inherited bleeding disorder caused by factor (F) VIII deficiency due to mutations in the FVIII gene (*F8*). HA accounts for about 80% of the cases of hemophilia, with a prevalence of 1:5,000-10,000 male births (Rizza & Spooner, 1993; Hedner, 2000). Treatment of HA requires life-long replacement of FVIII concentrates or, more recently, of non-factor based therapies prophylactically or on demand (Pasi et al, 2017; Mahlangu et al, 2018; Peters & Harris, 2018). One of the major complications of patients with HA (PHA) is the development of alloantibodies that inhibit the activity of FVIII (inhibitors). Inhibitors occur in approximately 30% and 10% of patients with severe and moderate/mild HA, respectively (Bayry et al, 2003). The main risk factors for the development of inhibitors in PHA are the presence of a family history of inhibitor, the type of *F8* mutation and the intensity of FVIII infusions (Lilicrap et al, 2014; Garagiola et al, 2018). However, it is not completely understood why frequent and intensive infusions of FVIII would lead to inhibitor development.

Recent studies suggest that treatment with repeated infusions of FVIII concentrates may alter the immune response and, therefore, contribute to the pathophysiology of inhibitor development (Hu et al, 2007; Chaves et al, 2010; Oliveira et al, 2013). These studies reported that anti-inflammatory/regulatory cytokines, mainly IL-4, IL-5 and IL-10, are at higher levels in patients with inhibitors in comparison with patients without. On the contrary, PHA without inhibitors show a predominance of pro-inflammatory mediators such as TNF, IFN- γ and IL-2 (Chaves et al, 2010; Oliveira et al, 2013). However, these studies had a cross-sectional design and therefore did not measure biomarkers in different time-points. Thus, we hypothesized that infusions of FVIII could lead to an imbalance of the immune system, which could influence the development of inhibitors. To test this hypothesis, we have evaluated the effects of the infusions of FVIII concentrate on biomarkers of the immune system in PHA during replacement therapy with FVIII concentrates.

METHODS

Study population

This study is a subproject of the HEMFIL Study, which is a prospective cohort study aimed at evaluating clinical, immunological and genetic factors related to the development of inhibitors in hemophilia (Jardim et al; 2017). We enrolled male PHA diagnosed with severe or moderately-severe forms of the disease (FVIII activity [FVIII:C] <2%) attended at five hemophilia treatment centers (HTC) in Brazil (HEMOMINAS in Minas Gerais; HEMOES in Espírito Santo; HEMEPAR in Paraná; HEMORIO in Rio de Janeiro, and HEMOSC in Santa Catarina). Patients were consecutively included by the assisting physicians at each HTC at the diagnosis of hemophilia and before the first infusion of FVIII or any blood components (previously untreated patients [T0/PUPs]) or after minimal treatment (minimally treated patients [T0/MTP]).

After inclusion, the patients' clinical and laboratory data were collected through standardized forms from the RODIN Study (Gouw et al, 2013), kindly provided by the Rodin Study Group with the addition of some variables of interest of our group. The forms were fully translated into Portuguese, which is the native language spoken in Brazil. The physicians at every HTC collected detailed history and assessed physical examination during the first clinical evaluation. Patients were followed up by the physicians in the HTC through a periodical clinical evaluation with intervals of up to 60 days, in which occasion they filled out standardized follow-up forms. Patients were followed until at least 75 exposure days (ED) (INB-) or inhibitor development (INB+).

For the control group, 20 healthy Brazilian male children in the same age group as the patients included in the project were included (median, 11.5 months; Interquartile range [IQR] 7.5-1.0 months). Control group participants were healthy male children, with unremarkable clinical examination, normotensive, with weight, height and body mass index (BMI) within normal range, normal renal function and no comorbidities.

All parents/guardians were informed about the study aims and signed a written informed consent form. The study was approved by the Institutional Ethics Committees.

Sample collection and processing

Venous blood was collected in tubes containing 3.2% sodium citrate (BD Biosciences, Changzhou, China) at the time of diagnosis of HA and during FVIII replacement therapy. Samples were centrifuged at 2,000 x g for 15 minutes at 18°C. Plasma was immediately aliquoted and frozen at -80°C until the performance of laboratory tests. Plasma samples were divided into four strata considering the ED to FVIII at the collection: before any exposure (T0); 1-20 ED; 21-75 ED and >75 ED. This strategy took into consideration that in most (79%) PHA who develop inhibitors it occurs until 20 ED (Peyvandi et al, 2016; Jardim et al, 2019). Therefore, we hypothesized that immune response/biomarkers could be distinct in those strata. Control samples were collected at the Pediatric Outpatient Clinic of the Clinical Hospital of the Universidade Federal de Minas Gerais.

Determination of the coagulant activity of FVIII

To define the type of hemophilia and classification of disease severity, FVIII:C test was performed in each HTC. Briefly, plasma samples were diluted 1:5 in Imidazole Buffer. This dilution was supplemented with 0.1 mL of FVIII deficient plasma and 0.1 mL cephalin. The mixture was incubated at 37°C for 3 minutes. A volume of 0.1 mL of calcium chloride (0.025 M) was added and the time of clot formation was recorded in a coagulometer. The result was provided in time and calculated in activity (%) using a calibration curve performed with control samples (plasma pool of normal controls). The tests were performed in duplicates and the final result was considered as the media between the two tests.

Inhibitor screening and titration

The inhibitor screening test is routinely performed in the coagulation laboratories of HTC as a screening method for the presence of inhibitors. The test is based on mixing the patient plasma with a pool of normal plasmas and incubating the mixture for 2 hours at 37°C to investigate the presence of inhibitors. When this test is positive, inhibitor titration must be carried out through the Bethesda test. Inhibitors were measured by Bethesda assay with Nijmegen modification in each HTC every 5-

10 ED. Once positive (≥ 0.6 Bethesda units [BU]/mL) the test was repeated with an interval of between two to four weeks. Inhibitors were considered positive (INB+) if both tests were ≥ 0.6 UB/mL.

To perform the test, plasma samples were incubated at 37°C for 2 hours with a pool of plasma of healthy individuals with normal concentrations of plasma FVIII (normal plasma pool). As control, a solution containing FVIII-deficient plasma and normal plasma pool was used. After incubation, residual FVIII:C was measured in the samples and in the control solution. According to the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) definition, inhibitor titers persistently lower than 5 BU/mL, despite constant stimulation with FVIII, are classified as low response inhibitors. In contrast, titers greater than or equal to 5 BU/mL on 1 or more occasions are considered high response inhibitors and may be maintained for several months even if the patient discontinues exposure to FVIII. A BU corresponds to the plasma dilution of the patient capable of neutralizing 50% of FVIII in a single volume of normal plasma (Verbruggen et al, 1995; 2002).

Assessment of anti-FVIII antibodies

Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) was performed for detection of anti-FVIII antibodies. For this, 96-well plates (Invitrogen™ Nunc MaxiSorp™, Thermo Scientific™, Massachusetts, USA) were sensitized overnight at 4°C with 100 μ L of recombinant FVIII (ADVATE® Alfa octocogque; Baxter, Lexington, USA) diluted in PBS 1X (0.1 IU/well). After incubation, plates were washed three times with 100 μ L/well of washing solution (PBS 1X 1% [Sigma-Aldrich, St. Louis, USA], Tween 20 [Sigma-Aldrich, St. Louis, USA] [PBS-W]) and incubated for 1 hour at 37°C with 200 μ L/well of blocking solution (PBS 1X [Sigma-Aldrich, St. Louis, USA], 1% bovine serum albumin [VWR Life Science, Radnor, USA]). Plates were then washed three times with 100 μ L/well of PBS-W. Plasma samples (100 μ L/well) diluted 1:40 in blocking solution were added and incubated for 1 hour at 37°C. Plates were washed three times with PBS-W and the reaction was quenched with 100 μ L/well of the following antibodies diluted in blocking solution: polyclonal goat anti-human IgM-Biotin, μ -chain specific (B1265, Sigma-Aldrich), diluted 1:40,000; monoclonal mouse anti-human IgG1-HRP, HP6188 (M1328, Sanquin, The Netherlands), diluted

1:10,000; monoclonal mouse anti-human IgG3-Biotin, HP6050 (B3523, Sigma-Aldrich), diluted 1:1,000; and monoclonal mouse anti-human IgG4-Biotin, HP6025 (B3648, Sigma-Aldrich), diluted 1:3,000. Experiments were performed separately for each subclass of antibodies (IgM, IgG1, IgG3 and IgG4). Plates were incubated for 1 hour at 37°C and washed three times with 100 µL/well of PBS-W after incubation period. Peroxidase-labeled Streptavidin (Sigma-Aldrich) (100 µL/well) diluted in blocking solution (1:5,000) was added to the wells and the plate was incubated for 30 minutes at room temperature. After five washing steps with 100 µL/well of PBS-W, 100 µL/well OPD (o-phenylenediamine) (Sigma-Aldrich) were added and the plate was incubated at room temperature and protected from light for 30 minutes. Optical density (OD) was measured using 492nm filter in ELISA reader after addition of 50 µL/well of 1M H₂SO₄ (Sigma-Aldrich). All experiments were performed in duplicates.

Determination of the anti-FVIII antibodies avidity index

Plasma samples from patients who had greater than average optical density (OD) results from controls plus three standard deviations (SD) were used in a test to determine the intensity with which IgG and IgM antibodies remain bound to the antigen. (ELISA-Avidity). In this technique, a 6 M urea solution was used to disrupt antibody-antigen interactions. The ELISA-Avidity technique was performed according to the conventional ELISA technique described above, except for the first wash after incubation with plasma samples, in which the wells, in duplicate, were incubated with a urea solution 6 M in 1X PBS for 10 minutes, while another duplicate of the same samples was incubated with PBS-W for 10 minutes.

For the evaluation of immunoglobulin avidity indices, results were expressed as Avidity Index (AI) and calculated as the ratio between OD values obtained from urea-treated (U+) and non-urea-treated (U-) samples, following the formula: $AI (\%) = [OD (U+)/OD (U-)] \times 100$. AI values <30% were considered low avidity, AI between 30% and 60% intermediate avidity and AI >60% high avidity (HEDMAN; ROUSSEAU, 1989).

Assessment of cytokines and chemokines

Plasma samples were thawed in water-bath for 5 minutes at 37°C and centrifuged for 10 minutes at 32,050 x g for separation of the platelet-poor plasma. Cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF, and IL-17A) and chemokines (CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 and CXCL10) were measured by flow cytometry using commercial kits (CBA - Cytometric Bead Array; BD Biosciences, San Jose, USA). Experiments were performed in duplicates according to the manufacturer's instructions. Samples were acquired in BD Accuri™ C6 Flow Cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Data were analyzed using FCAP software v1.0.1 (BD Biosciences). According to the manufacturer, the detection limits for each analyte were: IFN- γ (3.7 pg/mL), TNF (1.7 pg/mL), IL2 (2.6 pg/mL), IL-4 (0.4 pg/mL), IL-6 (1.9 pg/mL), IL-10 (1.5 pg/mL), IL-17A (8.3 pg/mL), CXCL8 (0.2 pg/mL), CCL5 (1.0 pg/mL), CXCL9 (2.5 pg/mL), CCL2 (2.7 pg/mL) and CXCL10 (2.8 pg/mL).

Molecular tests

Analysis of intron 1 (Inv1) and 22 (Inv22) inversions were performed on the samples collected in tubes containing EDTA at T0. Genomic DNA extraction was performed using a commercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), with silica column-based methodology. The inversions were detected using a PCR-based method according to established protocols (Pio et al, 2011; Rossetti et al, 2008).

Statistical analysis

The number of events and respective percentages were calculated for the categorical variables and the median with interquartile range (IQR) for the continuous variables. Comparison between groups was performed by a double-sided Mann–Whitney test. Correlation analyzes were performed using the Spearman correlation test. Data included in figures presented correlation coefficients above 0.5 to highlight the most important connections. Radar charts were constructed using the frequency of patients with high levels of cytokines and chemokines. The cut-off point between low and high levels was defined by calculation of the median of the values obtained for each cytokine and chemokines evaluated in each stratum. Comparisons of frequencies were made using the Fisher's exact test. The differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Study population

We enrolled 71 male children, with median age at the time of inclusion of 10.0 months (IQR, 6.0-14.0 months). All children were of Brazilian nationality. A total of 69 (97.2%) had severe HA (FVIII:C <1.0%) and two (2.8%) had moderately-severe HA (FVIII:C 1.0%-1.9%). PUPs and MTPs accounted for 57 (80.3%) and 14 (19.7%) of the cohort, respectively. For MTPs, the inclusion occurred with a median of 2.0 ED (IQR, 1.0-6.3). Twenty-nine patients (40.8%) developed inhibitors during the study. Inhibitor development occurred with a median of 13.0 ED (IQR, 8.8-18.0). Five patients (17.2% among INB+ group) developed inhibitors after 20 ED. Detailed information of included patients is summarized in Table 1.

Table 1. Characteristics of the patients

Age in months, median (IQR)	10.0 (6.0-14.0)
Severity of HA, n (%)	
Severe	69 (97.1)
Moderately severe	2 (2.9)
Race, n (%)	
White	42 (59.1)
Black	11 (15.5)
Mixed	9 (12.7)
Indian native	1 (1.4)
Asian	1 (1.4)
Unknown	7 (9.9)
Reason for diagnosis, n (%)	
Bleeding	37 (52.1)
Family history	12 (17.4)
Bleeding + Family history	20 (28.2)
Inversion status, n (%)	
Inv22	30 (42.3)
Inv1	1 (1.4)
No inversion detected	40 (56.3)
Inhibitor titer in BU/mL, median (IQR)	8.4 (3.1-58.3)
High titer, n (%)	20 (69.0)
Low titer, n (%)	9 (31.0)

IQR, Interquartile range; n, number of patients; BU, Bethesda units

Anti-FVIII antibodies

In the INB- group, levels of anti-FVIII IgM was higher in T0 (median OD, 0.132; IQR, 0.089-0.231) when compared with stratum 1-20 ED (median OD, 0.106; IQR, 0.072-0.147; $p=0.04$). In contrast, anti-FVIII IgG3 was higher in stratum 1-20 ED (median OD, 0.033; IQR, 0.001-0.073) when compared with T0 (median OD, 0.008; IQR, 0.000-0.031; $p=0.04$), 21-75 ED (median, 0.008; IQR, 0.000-0.019; $p=0.03$) and >75 ED (median OD, 0.000; IQR, 0.000-0.010; $p<0.01$) (Figure 1).

In the INB+ group, levels of anti-FVIII IgG4 was higher in the stratum 1-20 ED (median OD, 0.006; IQR, 0.000-0.025; $p<0.01$) and 21-75 ED (median OD, 0.004; IQR, 0.002-0.595; $p<0.01$) in comparison with T0 (median OD, 0.000; IQR, 0.000-0.000). We observed that in the 1-20 ED stratum, anti-FVIII IgG4 levels were higher in the INB+ group (median OD, 0.006; IQR, 0.000-0.025) when compared with in the INB- group (median OD, 0.000; IQR, 0.000-0.000; $p=0.01$). The two groups also differed in anti FVIII-IgG4 levels in the 21-75 ED stratum with INB+ group presenting higher levels (median OD, 0.004; IQR, 0.002-0.595) than the INB- group (median OD, 0.000; IQR, 0.000-0.008; $p=0.03$). Although the signal of anti-FVIII IgG4 was the lowest of all anti-FVIII antibodies tested, it still resulted in differences between the groups and strata analysed.

IgG1 showed no significant difference in any of the strata analyzed for neither groups, although there was a trend to higher levels in INB+ group in comparison with the INB- group in stratum 1-20 ED ($p=0.08$) (Figure 1).

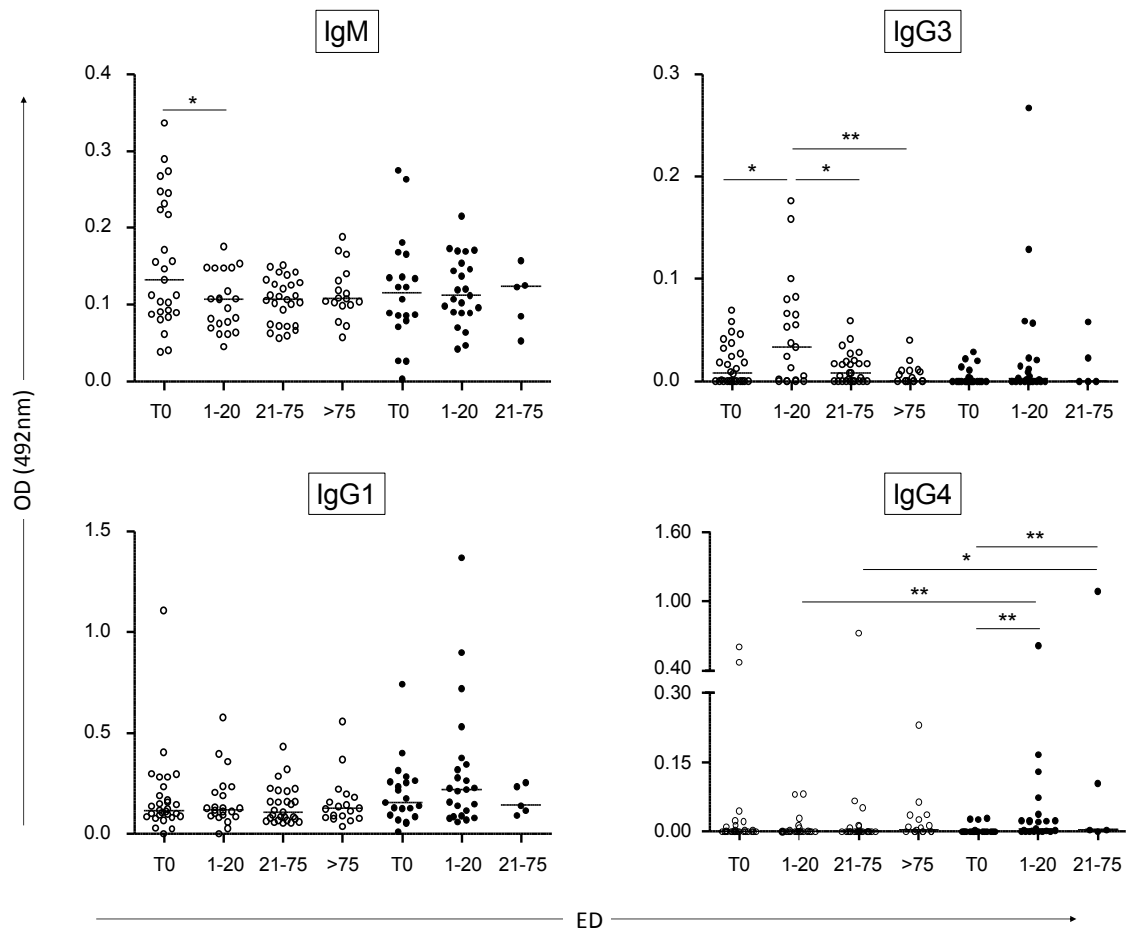


Figure 1. Levels of anti-FVIII IgM, IgG1, IgG3 and IgG4 antibodies in all included patients with hemophilia A by strata of exposure days. Each empty circle represents the mean OD of the immunoglobulin tested in duplicates in each patient without inhibitor. Each black circle represents the mean OD of the immunoglobulin tested in duplicates in each patient with high and low titer inhibitor. The horizontal lines represent the median OD of the samples in each stratum. ED, exposure days; T0, sample collected at inclusion of the patient in the study; OD, optical density; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Anti-FVIII antibodies avidity index

In AI analyzes, there was no significant difference between the INB- and INB+ groups for all subclasses. However, there was a tendency for increased anti-FVIII IgG4 AI in INB+ patients. The amount of IgM positive samples did not allow comparison between this immunoglobulin and the others. Results of antibody avidity indices are presented in Table 2.

Table 2. Results of avidity indices of anti-FVIII IgG1, IgG3 and IgG4 antibodies

	INB-		INB+		p
	n	AI Median (IQR)	n	AI Median (IQR)	
IgG1	9	77,9% (67,0-95,4%)	10	84,7% (76,4-91,2%)	0,368
IgG3	8	100,0% (100,0-100,0%)	4	100,0% (100,0-100,0%)	1,000
IgG4	9	63,7% (56,8-93,2%)	8	93,0% (79,2-96,4%)	0,207

IQR, Interquatile range; n, number of samples; p, p value.

Cytokines

In INB- group, levels of IL-6 (median, 9.32; IQR, 1.01-47.19) and IL-10 (median, 2.18; IQR, 0.28-17.01) were increased at T0 when compared with stratum 21-75 ED (median, 1.35; IQR, 0.00-3.48; p=0.002) and >75 ED (median, 0.69; IQR, 0.00-1.27; p=0.01) respectively. IL-10 presented increased levels in the stratum 21-75 ED (median, 1.71; IQR, 0.78-2.33) when compared with stratum >75 ED (median, 0.69; IQR, 0.00-1.27; p=0.01). In addition, levels of IL-17A were higher in T0 (median, 47.41; IQR, 1.63-141.80) when compared with strata 21-75 ED (median, 2.44; IQR, 0.89-6.07; p=0.01) and >75 ED (median, 2.24; IQR, 0.00-4.05; p=0.01). In INB+ group, levels of IL-4 was higher in the stratum 1-20 ED (median, 0.01; IQR, 0.00-0.03) when compared with the stratum 21-75 ED (median, 0.00; IQR, 0.00-0.60; p=0.04). No significant differences were found in the plasma levels of IL-2, IFN- γ and TNF between the strata nor between the groups (Figure 2).

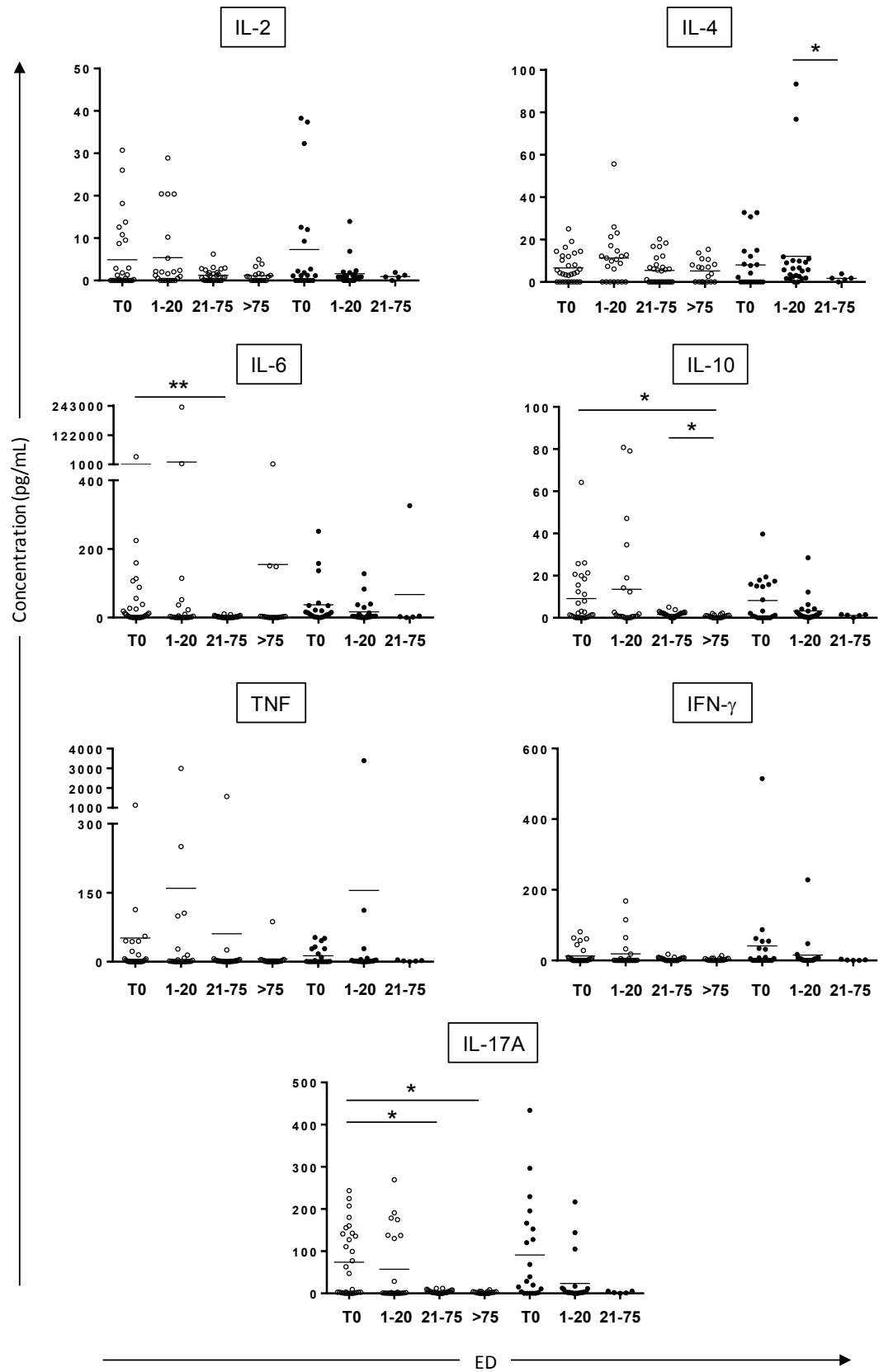


Figure 2. Representation of plasma cytokine levels in all patients with hemophilia A by strata of exposure days. Each empty circle represents the mean level of the cytokine tested in duplicates in each patient without inhibitor. Each black circle represents the mean cytokine level tested in duplicates in each patient with inhibitor. The horizontal lines represent the median level of cytokine in each stratum. ED, exposure day; T0, sample collected at inclusion of the patient in the study; *p<0.05; **p<0.01.

Chemokines

In INB- group, the levels of CXCL10 (median, 1982.0; IQR, 1211.0-3361.0), CCL2 (median, 254.4; IQR, 26.7-474.7), CXCL9 (median 4435.0; IQR, 748.1-6633.0), CCL5 (median, 4937.0; IQR, 3107.0-31340.0) and CXCL8 (median, 80.18; IQR, 7.76-143.3) were higher in T0 when compared with strata 1-20 ED ([median, 1074.0; IQR, 480.2-1732.0; p=0.004]; [median, 1194.0; IQR, 8.5-16.89; p=0.0001]; [median, 420.8; IQR, 170.2-1234.0; p=0.0001]; [median, 1624.0; IQR, 1324.0-2177; p=0.0001] and [median, 1.2; IQR, 0.00-2.11; p=0.0001], respectively) and >75 ED ([median, 955.4; IQR, 698.2-1413.0; p=0.0007]; [median, 1187.0; IQR, 5.4-14.0; p=0.0001]; [median, 495.6; IQR, 560.3-1112.0; p=0.0024]; [median, 1510.0; IQR, 1149.0-1774; p=0.0001] and [median, 1.97; IQR, 1.04-11.2; p=0.0001], respectively). In addition, in the stratum 1-20 ED, the levels of CXCL10 (median 1963.0, IQR, 1250.0-3159.0), CCL2 (median 54.7, IQR, 7.8-367.4) and CXCL9 (median 2989.0, IQR, 653.7-8407.0) were higher when compared with strata 21-75 ED ([median, 1074.0; IQR, 480.2-1732; p=0.0044]; [median, 1194.0; IQR, 8.5-16.89; p=0.0314]; [median, 420.8; IQR, 170.2-1234.0; p=0.0003]) and >75 ED ([median, 955.4; IQR, 698.2-1413.0; p=0.0013]; [median, 1187.0; IQR, 5.37-14.0; p=0.0028]; [median, 495.6; IQR, 560.3-1112.0; p=0.0049], respectively). The levels of CCL5 (median 2969.0, IQR, 1330.0-28262.0) were the highest in the stratum 1-20 ED when compared with the stratum >75 ED (median, 1510.0; IQR, 1149.0-1774; p=0.018).

In INB+ group, the levels of CXCL10 (median 2795.0, IQR, 1352.0-3550.0) CXCL9 (median, 5900.0; IQR, 2982.0-9629.0) and CCL5 (median, 5298.0; IQR, 3599.0-30251.0) were higher in T0 when compared with strata 1-20 ED ([median, 714.3; IQR, 521.3-1539.0; p=0.004]; [median, [median, 280.7; IQR, 101.0-982.2; p=0.0001] and [median, 2508.0; IQR, 1782.0-3108.0; p=0.0001], respectively) and 21-75 ED ([median, 550.8; IQR, 370.0-1574.0; p=0.04]; [median, 84.7; IQR, 55.7-832.2; p=0.04,] and [median, 3178.0; IQR, 2115.0-3278.0; p=0.01], respectively). In addition, the levels of CXCL8 (median, 117.2; IQR, 42.7-332.9) and CCL2 (median, 292.0; IQR, 181.6-478.6) were higher in T0 when compared with the stratum 1-20 ED ([median, 4.5; IQR, 2.2-15.3; p=0.0003] and [median, 14.0; IQR, 7.0-27.1; p=0.001], respectively) (Figure 3).

The comparison of INB- and INB+ groups revealed that the levels of CXCL10 (median, 1963.0, IQR, 1250.0-3159.0) and CXCL9 (median, 2989.0, IQR, 653.7-8407.0) were higher in stratum 1-20 ED of the INB- when compared with INB+ group ([median, 714.3; IQR, 521.3-1539.0; $p=0.004$] and [median, 280.7; IQR, 101.0-982.2; $p=0.0005$], respectively). Levels of CCL5 (median, 3178.0, IQR, 2115.0-3278.0) were higher in the stratum 21-75 ED of the INB+ group in comparison with INB- group (median, 1510.0, IQR, 1149.0-1774.0; $p=0.04$) (Figure 3).

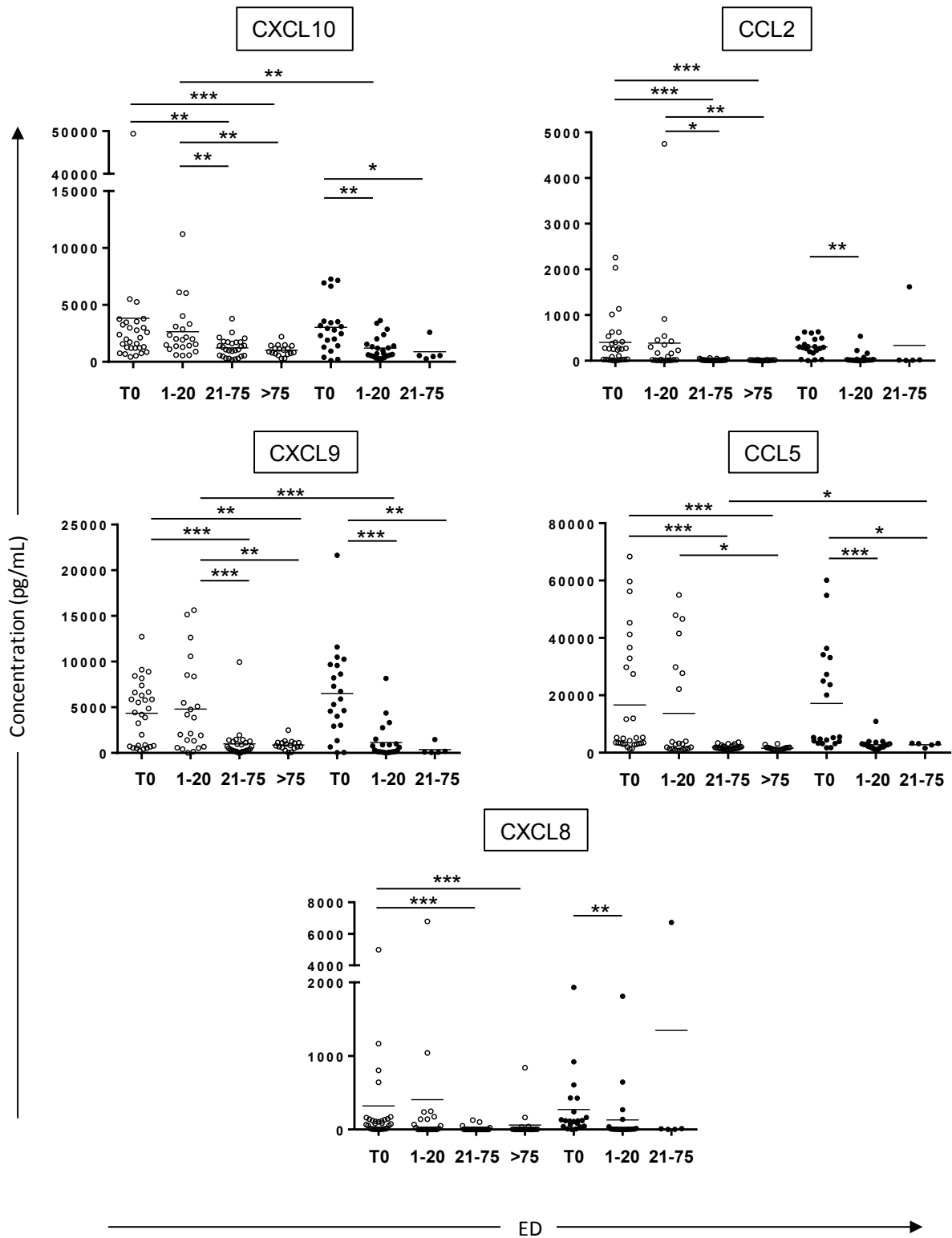
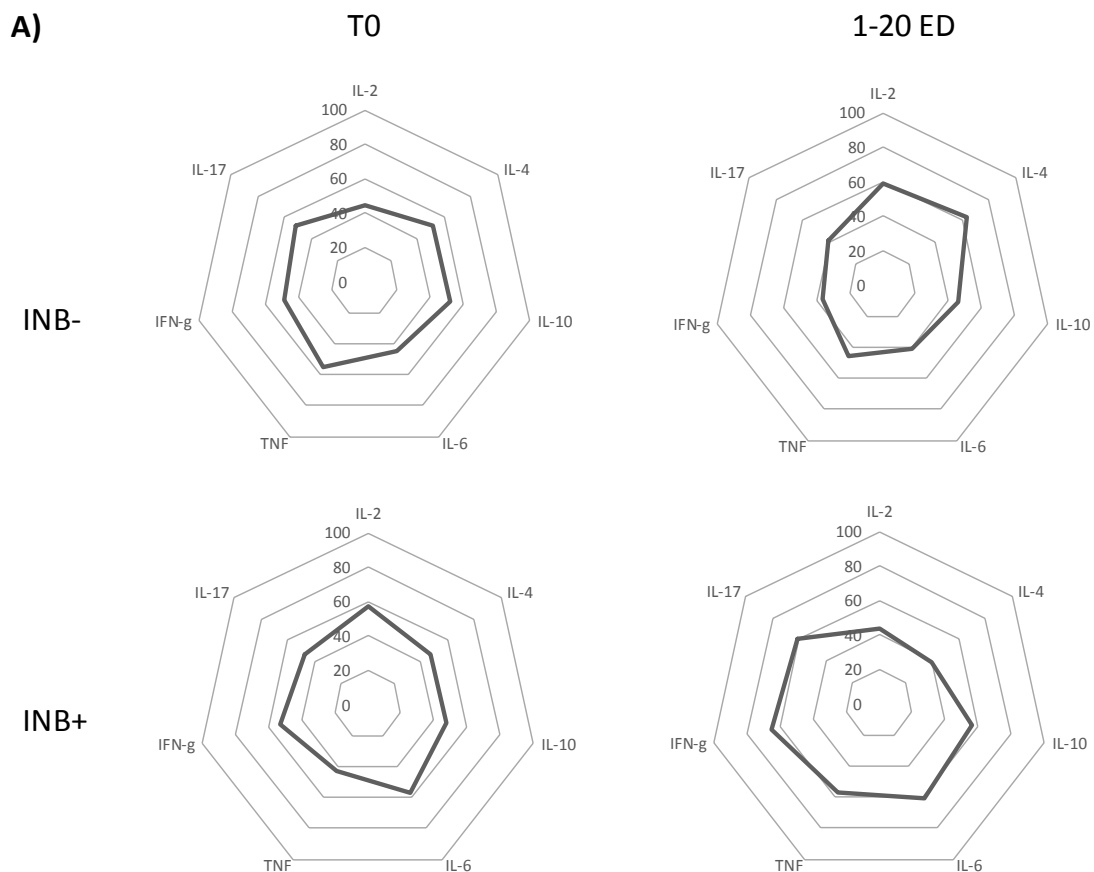


Figure 3. Representation of plasma chemokine levels in all patients with hemophilia A by strata of exposure days. Each empty circle represents the mean level of the chemokine tested in duplicates in each patient without inhibitor. Each black circle represents the mean chemokine tested in duplicates in each patient with inhibitor. The horizontal lines represent the median level of chemokine in each stratum. ED, exposure days; T0, sample collected at inclusion of the patient in the study; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

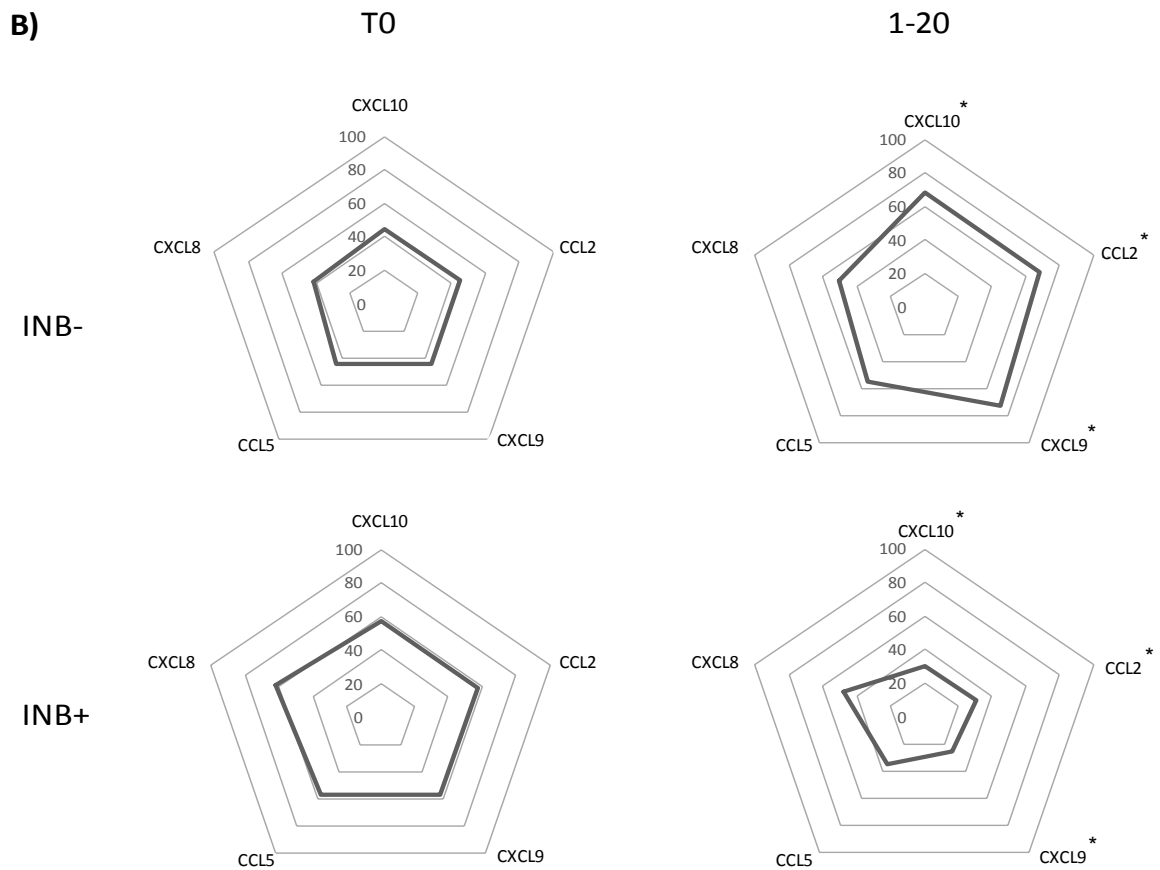
Radar graphics

The radar graphs illustrate the frequency of patients presenting with high plasma concentration of cytokines and chemokines in INB- and INB+ groups. There was no significant difference in cytokine analysis between the groups (Figure 4A).

Analyzes of the chemokines profile in the stratum 1-20 ED revealed that in the INB- group there was a significantly higher proportion of patients with increased levels of CXCL10 (68.2% versus 30.4%; $p=0.02$), CCL2 (68.2% versus 30.4%; $p=0.02$) and CXCL9 (72.7% versus 26.1%; $p=0.001$) when compared with the INB+ group, respectively (Figure 4B).



Group	IL-2, n (%)	IL-4, n (%)	IL-10, n (%)	IL-6, n (%)	TNF, n (%)	IFN- γ , n (%)	IL-17A, n (%)
INB- T0	13 (44,8)	15 (51,7)	15 (51,7)	13 (44,8)	16 (55,2)	14 (48,3)	15 (51,7)
INB+ T0	12 (57,1)	10 (47,6)	10 (47,6)	12 (57,1)	9 (42,9)	11 (52,4)	10 (47,6)
INB- 1-20 ED	13 (59,1)	14 (63,6)	10 (45,5)	9 (40,9)	10 (45,5)	8 (36,4)	9 (40,9)
INB+ 1-20 ED	10 (43,5)	9 (39,1)	13 (56,5)	14 (60,9)	13 (56,5)	15 (65,2)	14 (60,9)



Group	CCL2, n (%)	CCL5, n (%)	CXCL8, n (%)	CXCL9, n (%)	CXCL10, n (%)
INB- T0	13 (44,8)	13 (44,8)	12 (41,4)	13 (44,8)	13 (44,8)
INB+ T0	12 (57,1)	12 (57,1)	13 (61,9)	12 (57,1)	12 (57,1)
INB- 1-20 ED	15 (68,2)*	12 (54,5)	11 (50,0)	16 (72,7)**	15 (68,2)*
INB+ 1-20 ED	7 (30,4)*	8 (34,8)	11 (47,8)	6 (26,1)**	7 (30,4)*

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Figure 4. Radar graphical representation of plasma levels of cytokines (A) and chemokines (B) patterns in patients with and without inhibitors in the T0 and 1-20 DE stratum. Each axis represents the proportion of individuals with cytokine and chemokine levels above the median. The increase or decrease of the areas of the central polygon respectively reflects the more or less contribution of the inflammatory or regulatory balance of cytokines and chemokines in INB+ and INB-. The contingency table presents the frequency of individuals with high levels of each cytokine and chemokine in patients with and without inhibitors in each stratum. The comparison between groups was performed using the χ^2 test. The differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. ED, exposure days; T0, sample collected at inclusion of the patient in the study.

Correlation Network analysis

The correlation network analysis was performed to study positive and negative correlations between each biomarker analyzed. In patients at T0 INB+, CXCL9 correlated negatively with IgG3 ($r = -0.504$; $p = 0.02$), TNF ($r = -0.578$; $p = 0.01$) and IL-4

($r=-0.509$; $p=0.02$). In INB- group, CCL5 correlated negatively with IgG3 ($r=-0.520$; $p=0.01$) in T0. In 1-20 ED stratum, CXCL9 correlated negatively with IL-2 ($r=-0.636$; $p=0.001$) in INB+ (Figure 5).

In 21-75 ED stratum, in INB+ group, CCL2 had strong positive correlation with CXCL8 ($r=1.000$; $p=0.02$) and IL-6 ($r=1.000$; $p=0.02$). CXCL8 correlated positively with IL-6 ($r=1.000$; $p=0.02$). In addition, negative correlation was detected between CXCL9 and TNF ($r=-1.000$; $p=0.02$). IgG4 correlated negatively with IFN- γ ($r=-0.947$; $p=0.02$), which in turn had a positive correlation with IL-10 ($r=0.975$; $p=0.02$) in INB+ group. In INB- group, CXCL9 correlated negatively with IL-17A ($r=-0.709$; $p=0.0001$), IFN- γ ($r=-0.689$; $p=0.0001$), IL-6 ($r=-0.546$; $p=0.003$), IL-2 ($r=-0.577$; $p=0.002$) and CCL5 ($r=-0.582$; $p=0.001$); CXCL10 correlated negatively with IFN- γ ($r=-0.554$; $p=0.003$) and CCL5 ($r=-0.587$; $p=0.001$). In addition, CCL5 correlated positively with IL-6 ($r=0.542$; $p=0.003$), IL-17A ($r=0.669$; $p=0.0001$) and IFN- γ ($r=0.547$; $p=0.003$). In INB- group, it is important to notice that significant negative correlation was observed between IgG1 and IL-4 ($r=-0.528$, $p=0.005$), IL-6 ($r=-0.600$, $p=0.001$), IL-10 ($r=-0.646$, $p=0.0003$), TNF ($r=-0.646$, $p=0.0003$), IFN- γ , ($r=-0.698$, $p<0.001$) and IL-17A ($r=-0.664$, $p=0.0002$) in 21-75 ED stratum (Figure 5).

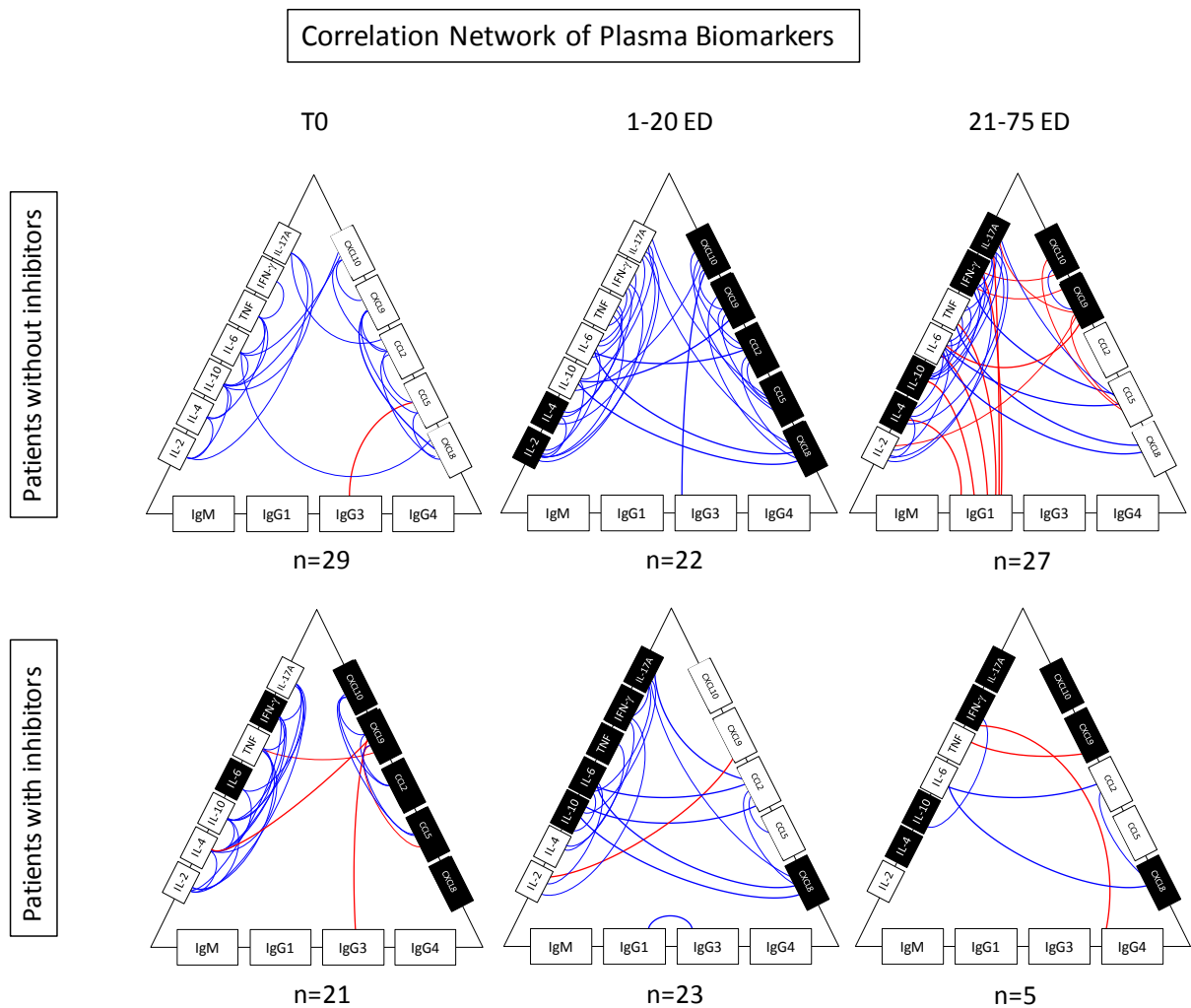


Figure 5. Correlation network of immunological biomarkers. The blue lines correspond to the positive correlation between the biomarkers. The red lines correspond to the negative correlation between the biomarkers. Black rectangles represent biomarkers with plasma levels (pg/mL) above the median and white rectangles represent biomarkers with plasma levels below the median. n, number of patients; ED, exposure days; T0, sample collected at inclusion of the patient in the study.

DISCUSSION

We studied the effect of FVIII concentrate infusions on immunological biomarkers in a prospective cohort of PUPs and MTP with HA throughout the replacement therapy until at least 75 ED or inhibitor development. We found that pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-17, TNF and IFN- γ) and subclasses IgG1 and IgG4 were increased in PHA with inhibitors in comparison with PHA without inhibitors after exposure to FVIII. In the 21-75 ED stratum, IgG1 correlated negatively with IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF and IFN- γ in the INB- group. Levels of CCL2, CXCL9 and CXCL10 were higher in INB- when compared with INB+ group.

Inhibitor development in HA involves a classical T-cell dependent immune response initiated by the exposure of FVIII-derived peptides in the surface of antigen presenting cells by MHC-II molecules. The recognition of these antigens by CD4+ T cells culminate in the activation of FVIII-specific B-cells that initiate the secretion of antibodies (inhibitors). This process is orchestrated by a cytokine and chemokine microenvironment (Delignat et al, 2019). In this context, cytokines influence the activity, differentiation, proliferation, and survival of immune cells (Lin et al, 2000). Chemokines act as chemoattractants to circulating leukocytes inducing their migration toward sites of inflammation or injury (Charo & Ransohoff, 2006).

In our study, in the two groups evaluated we observed a pattern of downregulation of chemokines and cytokines after the first days of exposure to FVIII, except for IL-4 and IL-6. The decrease of chemokines and cytokines in INB- group particularly occurs after 20 ED to FVIII. Interestingly, this pattern is observed during the first ED in INB+ group. Despite this, cytokine profile of INB- and INB+ groups did not differ, neither in T0 nor after exposure to exogenous FVIII.

Some studies have reported that cytokines play an important role in the immune response involved in the development of inhibitors (Chaves et al, 2010; Oliveira et al, 2013). However, chemokines have been less explored in this setting (Jardim et al, 2017; Sun et al, 2018). Our study suggests that chemokines are the key elements differentiating INB- and INB+ groups during the first exposures to FVIII. Analyzes of 1-20 ED stratum revealed significantly lower levels of CCL2, CXCL9 and CXCL10 in the INB+ group when compared with INB-. CXCL9 and CXCL10 are involved in the recruitment of effector T cells to sites of inflammation (Luster, 1998) and CCL2 mediates migration of monocytes and macrophages and their infiltration at inflammation sites (Deshmane et al, 2009). The spleen plays a major role in augmenting systemic immune responses to blood borne pathogens and antigens, as it is rich in antigen presenting cells, and effector lymphocytes which produce appropriate adaptive immunological responses (Mebius & Kraal, 2005; Bronte & Pittet, 2013). Considering that the spleen is the main site of specific immune response against FVIII (Reipert, 2016; Zerra et al, 2017), the low levels of chemokines in plasma detected in INB+ in this study could be due to retention of these chemokines in the spleen (Cerutti et al, 2013).

In our study, we observed a similar uniform pattern of cytokine profile at T0 in INB- and INB+ groups. However, after exposure to FVIII, cytokines and chemokines in INB- and INB+ groups are in the opposite direction. After exposure to FVIII (stratum 1-20 ED), we noted that INB- group tended to have a higher proportion of individuals with an immune response regulated by IL-2 and IL-4. In counterpart, INB+ group tended to have a greater proportion of patients with a pro-inflammatory response induced by IL-6, IL-17, TNF and IFN- γ . INB+ group also showed a trend towards a higher proportion of patients with increased levels of all chemokines in T0. Interestingly, after exposure to exogenous FVIII (1-20 ED stratum), differences in INB- and INB+ groups were identified. INB- group had a higher proportion of patients with significantly high levels of CCL2, CXCL9 and CXCL10, which was not observed in the INB+ group.

In this study, we also assess anti-FVIII-specific immunoglobulin profile of HA patients. The two groups of patients evaluated showed similar levels of anti-FVIII IgM in all strata. A previous study using animal model of hemophilia detected higher titers of anti-FVIII IgM one to three weeks after the first two exposures to exogenous FVIII, even without the detection of inhibitors by the Bethesda assay, suggesting that anti-FVIII IgM is likely a non-inhibitory antibody (Qadura et al, 2011). A recently published cross-sectional study showed that IgM-secreting B-cells can be detected in adult patients with HA and in healthy individuals even in the absence of inhibitors (Diaz et al., 2016). However, none of these studies have evaluated anti-FVIII IgM throughout the treatment of patients with HA. Despite this, the available results suggest that anti-FVIII IgM may not be relevant as a biomarker of inhibitor development in patients with HA.

The analyses of anti-FVIII IgG3 levels in INB- and INB+ groups revealed no significant difference, except for a significant increase of this immunoglobulin in the 1-20 ED stratum compared with the other strata in INB- group. Previous study using an animal model showed that pro-inflammatory cytokines is associated with increase of IgG3 production (Germann et al, 1995). In our study, we did not find correlation between IgG3 and cytokines, although we found correlation between IgG3 and chemokines in both groups. Despite this finding, anti-FVIII IgG3 seems to be not relevant as a biomarker of inhibitor development. Several previous studies have found low levels of this immunoglobulin in patients with HA without inhibitor (Van

Helden et al, 2008; Boylan et al, 2015; Montalvão et al, 2015). In our study, low levels of IgG3 were also identified in both groups.

Analysis of IgG1 antibodies did not show difference between INB- and INB+ groups nor between the strata in each group. However, there was a trend towards a higher level of anti-FVIII IgG1 in the INB+ group in the 1-20 ED stratum. A previous study demonstrated that anti-FVIII immune response is characterized by a more prominent appearance of IgG1 antibodies in animal models and a direct relationship between the formation of inhibitors and the synthesis of anti-FVIII IgG1 after four ED to FVIII (Qadura et al, 2011). It is well established that IgG1 and IgG4 are the major subclasses of antibodies present in patients who develop inhibitors (Chaves et al, 2010; Whelan et al, 2013; Boylan et al, 2015). In our study, anti-FVIII IgG4 in the INB+ group was significantly higher in the strata 1-20 ED and 21-75 ED when compared with T0. Our results corroborate with the findings of previous studies (Chaves et al, 2010; Whelan et al, 2013; Boylan et al, 2015). However, anti-FVIII IgG4 and IgG1 showed low signals in both groups and in all strata. In spite of this, most INB+ patients presented high titers of inhibitors. We hypothesize that this result can be explained by the formation of FVIII immune complexes more easily detected in Bethesda assay (Lazarchick & Hoyer, 1977; Hartholt et al, 2017).

Considering that interactions between cytokines and chemokines may play an important and essential role in the development of inhibitors, we performed a correlation network analysis to evaluate the significance of the interactions between these molecules in patients with and without inhibitors. It was possible to observe a few interactions between cytokines, chemokines and antibodies in the INB- group at T0. The INB+ group showed increased levels of IL-6, IFN- γ and all chemokines at T0. After exposure to FVIII, we observe the correlation between cytokines and chemokines increased in the INB- group. Conversely, there was few correlations in the INB+ group, although patients in this group produced higher levels of CXCL8 and pro-inflammatory cytokines. Studies using animal models have demonstrated that elevated levels of anti-inflammatory cytokines and lower levels of pro-inflammatory cytokines contribute to extended tolerance to FVIII (Ragni et al, 2009; Gaitonde et al, 2012). Some studies indicated higher levels of anti-inflammatory/regulatory cytokines in patients with inhibitors, as well as the lower production of inhibitors in individuals with predominance of pro-inflammatory mediators (Hu et al, 2007; Chaves et al,

2010; Oliveira et al, 2013). However, these studies have been performed in adult patients with several ED to FVIII. Corroborating with our findings, a recent study showed that pro-inflammatory cytokines and chemokines were significantly elevated in mice with HA positive for FVIII inhibitors. In addition, low plasma levels of anti-inflammatory cytokines were detected in mice with inhibitors, suggesting that decreased anti-inflammatory cytokines and increased pro-inflammatory cytokines and chemokines create an environment conducive to the immune response for the development of antibodies against FVIII (Sun et al, 2018).

Interestingly, in the 21-75 ED stratum of INB- group we observed an even greater increase in the correlations between cytokines and chemokines and negative correlations between IgG1 and the cytokines IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF and IFN- γ . IL-4 and IL-10 are anti-inflammatory/regulatory Th2 cytokines that inhibit Th1 cell proliferation (Saraiva & O'Garra, 2010; Sachin et al, 2012). A greater proportion of patients in the INB- group had higher levels of IL-4 and IL-10 that were possibly inhibiting IgG1, which is evidenced by the negative correlation between these cytokines. The levels of IL-17A and IFN- γ were also higher levels in INB- group. IFN- γ is a pro-inflammatory cytokine, which major functions are activation of macrophages, increasing expression of MHC molecules, change of Ig class and Th2 suppression (Maeyer & Maeyer-Guignard, 1992). The higher expression of IL-4, IL-10, IL-17A and IFN- γ and the positive correlations between these cytokines in the INB- group in the 21-75 ED stratum may indicate an attempt to balance the anti-inflammatory/regulatory microenvironment. Correlation network analyzes in the INB+ group in stratum 21-75 ED do not allow us to draw solid conclusions because of the small number of samples included.

This study had some limitations. First, some measurements were missing in some strata. Secondly, it was not possible to compare the INB- and INB+ groups in the 21-75 ED stratum because only five patients developed inhibitors after 20 ED.

We showed that pro-inflammatory cytokines and subclasses IgG1 and IgG4 were increased in PHA with inhibitors and reduced in PHA without inhibitors after exposure to FVIII. Our results suggest that FVIII acts as an immunomodulator of the immune system inducing the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines and, consequently, leading to an increase of anti-FVIII IgG1 and IgG4 in PHA with

inhibitors. Chemokines seems to be the key elements that differentiate the INB- and INB+ groups during the first exposures to FVIII.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Jan Voorberg for kindly providing antibodies. The authors also thank all patients and their parents/guardians and staff from HEMOMINAS, HEMEPAR, HEMOES, HEMOSC and HEMORIO for supporting this study. This study was funded by Government grants from FAPEMIG (CDS – APQ-04185-10 and CDS – PPM-00205-14), CAPES (grant number 88881.068041/2014-01) and CNPq (grant number 456080/2014-7). LMMO received fellowships from CAPES. DGC received a BIP fellowship from FAPEMIG.

Authors contribution

LMMO performed the research, analyzed the data and wrote the paper; MPS, MHC, CSL and VKBF selected the patients and collected clinical data; LWZ performed the molecular tests; DGC and SMR designed the research, contributed to data analysis and wrote the paper. All authors revised and approved the final version of the manuscript.

References

- BAYRY, J.; LACROIX-DESMAZES, S.; PASHOV, A.; STAHL, D.; HOEBEKE, J.; KAZATCHKINE, M.D.; KAVERI, S.V. Autoantibodies to factor VIII with catalytic activity. **Autoimmunity Reviews**, v.2, p.30–35, 2003.
- BOYLAN, B.; RICE, A. S; DUNN, A. L; TARANTINO, M. D.; BRETTLER, D. B.; BARRETT, J. C.; MILLER, C. H.; THE HEMOPHILIA INHIBITOR RESEARCH STUDY INVESTIGATORS. Characterization of the anti-factor VIII immunoglobulin profile in patients with hemophilia A by use of a fluorescence-based immunoassay. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.13, p.47–53, 2015.
- BRONTE, V.; PITTET, M. J. The Spleen in Local and Systemic Regulation of Immunity. **Immunity**, v.39, p.806–818, 2013.
- CERUTTI, A.; COLS, M.; PUGA, I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. **Nature Reviews Immunology**, v.13, p.118–132, 2013.

- CHARO, I. F.; RANSOHOFF, R. M. The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. **New England Journal of Medicine**, v.354, p.610–621, 2006.
- CHAVES, D. G.; RODRIGUES, C. V.; OLIVEIRA, C. A.; TEIXEIRA, C.; SANTORO, M. M.; MARTINS-FILHO, O. A. 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: Cytokine profile and anti-FVIII inhibitors in haemophilia A. **Clinical & Experimental Immunology**, v.162, p.425–437, 2010.
- DE MAEYER, E.; DE MAEYER-GUIGNARD, J. Interferon- γ . **Current Opinion in Immunology**, v.4, p.321-326, 1992.
- DELIGNAT, S.; RAYES, J.; RUSSICK, J., KAVERI, S.; LACROIX-DESMAZES, S.; THE ABIRISK CONSORTIUM. Inhibitor Formation in Congenital Hemophilia A: an Immunological Perspective. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v.44, p.517–530, 2018.
- DESHMANE, S. L.; KREMLEV, S.; AMINI, S.; SAWAYA, B. E. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v.29, p.313–326, 2009.
- DIAZ, I.; BOLLORÉ, K.; TUAILLON, E.; LAPALUD, P.; GIANSILY-BLAIZOT, M.; VENDRELL, J. P.; SCHVED, J. F.; LAVIGNE-LISSALDE, G. Circulating FVIII-specific IgG, IgA and IgM memory B cells from haemophilia A patients. **Haemophilia**, v.22, p.799–805, 2016.
- GADANI, S. P.; CRONK, J. C.; NORRIS, G. T.; KIPNIS, J. IL-4 in the Brain: A Cytokine To Remember. **The Journal of Immunology**, v.189, p.4213–4219, 2012.
- GAITONDE, P.; PENG, A.; STRAUBINGER, R. M.; BANKERT, R. B.; BALU-IYER, S. V. Downregulation of CD40 Signal and Induction of TGF- β by Phosphatidylinositol Mediates Reduction in Immunogenicity Against Recombinant Human Factor VIII. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.101, p.48–55, 2012.
- GARAGIOLA, I.; PALLA, R.; PEYVANDI, F. Risk factors for inhibitor development in severe hemophilia A. **Thrombosis Research**, v.168, p.20–27, 2018.
- GERMANN, T.; BONGARTZ, M.; DLUGONSKA, H.; HESS, H.; SCHMITT, E.; KOLBE, L.; KOLSCH, E.; PODLASKI, F. J.; GATELY, M.; RUDE, E. Interleukin-12 profoundly up-regulates the synthesis of antigen-specific complement-fixing IgG2a, IgG2b and IgG3 antibody subclasses in vivo. **European Journal of Immunology**, v.25, p.823–829, 1995.
- GOUW, S. C.; VAN DEN BERG, H. M.; 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, R. P.; MANCUSO, M. E.; RAFOWICZ, A.; WILLIAMS, M.; CLAUSEN, N.; MIDDELBURG, R. A.; LJUNG, R.; VAN DER BOM, J. G.; 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**, v.121(20), p.4046-55, 2013.
- HARTHOLT, R. B.; WROBLEWSKA, A.; HERCZENIK, E.; PEYRON, I.; TEN BRINKE, A.; RISPENS, T.; NOLTE, M. A.; SLOT, E.; CLAASSENS, J. W.; NIMMERJAHN, F.; VERBEEK, J.; S.; VOORBERG, J. Enhanced uptake of blood coagulation factor VIII containing immune complexes by antigen presenting cells. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.15, p.329–340, 2017.
- HEDMAN, K.; ROUSSEAU, S. A. Measurement of avidity of specific IgG for verification of recent primary rubella. **Journal of Medical Virology**, v.27, p.288–292, 1989.

HEDNER, U. Congenital Hemorrhagic Disorders: New Insights into the Pathophysiology and Treatment of Hemophilia. **Hematology**, v.2000, p.241–265, 2000.

HU, G.; GUO, D.; KEY, N. S.; CONTI-FINE, B. M. Cytokine production by CD4+ T cells specific for coagulation factor VIII in healthy subjects and haemophilia A patients. **Thrombosis and Haemostasis**, v.97, p.788–794, 2007.

JARDIM, L. L.; CHAVES, D. G.; SILVEIRA-CASSETTE, A. C.O.; SILVA, A. C. S.; SANTANA, M. P.; CERQUEIRA, M. H.; PREZOTTI, A.; LORENZATO, C.; FRANCO, V.; VAN DER BOM, J. G.; REZENDE, S. M. Immune status of patients with haemophilia A before exposure to factor VIII: first results from the HEMFIL study. **British Journal of Haematology**, v.178, p.971–978, 2017.

JARDIM, L. L.; VAN DER BOM, J.; BROMMSCHENKEL, C. C.; GOUW, S. C.; REZENDE, S. M.; ON THE BEHALF OF THE HEMFIL STUDY GROUP. Inhibitor incidence in haemophilia A under exclusive use of a third-generation recombinant factor VIII concentrate: results of the HEMFIL Cohort Study. **British Journal of Haematology**, v.186, p.152–155, 2019.

LAZARCHICK, J.; HOYER, L. W. The Properties of Immune Complexes Formed by Human Antibodies to Factor VIII. **Journal of Clinical Investigation**, v.60, p.1070–1079, 1977.

LILLICRAP, D.; FIJNVANDRAAT, K.; SANTAGOSTINO, E. Inhibitors - genetic and environmental factors. **Haemophilia**, v.20, p.87–93, 2014.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v.127, p.117–126, 2000.

LUSTER, A. D. Chemokines — Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation. **New England Journal of Medicine**, v.338, p.436–445, 1998.

MAHLANGU, J.; CERQUIERA, M.; SRIVASTAVA, A. Emerging therapies for haemophilia - Global perspective. **Haemophilia**, v.24, p.15–21, 2018.

MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nature Reviews Immunology**, v.5, p.606–616, 2005.

MONTALVÃO, S. A. L.; TUCUNDUVA, A. C.; SIQUEIRA, L. H.; SAMBO, A. L.; MEDINA, S. S.; OZELO, M. C. A longitudinal evaluation of anti-FVIII antibodies demonstrated IgG4 subclass is mainly correlated with high-titre inhibitor in haemophilia A patients. **Haemophilia**, v.21, p.686–692, 2015.

OLIVEIRA, C. A.; VELLOSO-RODRIGUES, C.; MACHADO, F. C.; CARVALHO, B. N.; GENTZ, S. H.; MARTINS-FILHO, O. A.; CHAVES, D. G. Cytokine profile and FVIII inhibitors development in haemophilia A. **Haemophilia**, v.19, p.e139–e142, 2013.

PASI, K. J.; RANGARAJAN, S.; GEORGIEV, P.; MANT, T.; CREAGH, M. D.; LISSITCHKOV, T.; BEVAN, D.; AUSTIN, S.; HAY, C. R.; HEGEMANN, I.; KAZMI, R.; CHOWDARY, P.; GERCHEVA-KYUCHUKOVA; MAMONOV, V.; TIMOFEEVA, M.; SOH, C-H.; GARG, P.; VAISHNAW, A.; AKINC, A.; SØRENSEN, B.; RAGNI, M. V. Targeting of Antithrombin in Hemophilia A or B with RNAi Therapy. **New England Journal of Medicine**, v.377, p.819–828, 2017.

PETERS, R.; HARRIS, T. Advances and innovations in haemophilia treatment. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.17, p.493–508, 2018.

PEYVANDI, F.; MANNUCCI, P. M.; GARAGIOLA, I.; EL-BESHLAWY, A.; ELALFY, M.; RAMANAN, V.; ESHGHI, P.; HANAGAVADI, S.; VARADARAJAN, R.; KARIMI, M.; MANGLANI, M. V.; ROSS, C.; YOUNG, G.; SETH, T.; APTE, S.; NAYAK, D. M.; SANTAGOSTINO, E.; MANCUSO, M. E.; SANDOVAL GONZA, A. C.; MAHLANGU, J. N.; BONANAD BOIX, S.; CERQUEIRA, M.; EWING, N. P.; MALE, C.; OWDAIDAH, T.; SOTO ARELLANO, V.; KOBRINSKY, N. L.; MAJUMDAR, S.; PEREZ GARRIDO, R.; SACHDEVA, A.; SIMPSON, M.; THOMAS, M.; ZANON, E.; ANTMEN, B.; KAVAKLI, K.; MANCO-JOHNSON, M. J.; MARTINEZ, M.; MARZOUKA, E.; MAZZUCCONI, M. G.; NEME, D.; PALOMO BRAVO, A.; PAREDES AGUILERA, R.; PREZOTTI, A.; SCHIMITT, K.; WICKLUND, B. M.; ZULFIKAR, B.; ROSENDAAL, F. R. A Randomized Trial of Factor VIII and Neutralizing Antibodies in Hemophilia A. **New England Journal of Medicine**, v.374, p.2054–2064, 2016.

QADURA, M.; WATERS, B.; BURNETT, E.; CHEGENI, R.; HOUGH, C.; OTHMAN, M.; LILLICRAP, D. Immunoglobulin isotypes and functional anti-FVIII antibodies in response to FVIII treatment in Balb/c and C57BL/6 haemophilia A mice: IMMUNE RESPONSES TO FVIII IN Balb/c AND C57BL/6 HAEMOPHILIC MICE. **Haemophilia**, v.17, p.288–295, 2011.

RAGNI, M. V.; WU, W.; LIANG, X.; HSIEH, C.; CORTESE-HASSETT, A.; LU, L. Factor VIII-pulsed dendritic cells reduce anti-factor VIII antibody formation in the hemophilia A mouse model. **Experimental Hematology**, v.37, p. 744–754, 2009.

REIPERT, B. M. B-cell memory against factor VIII. **Cellular Immunology**, v.301, p.49–58, 2016.

RIZZA, C. R.; SPOONER, R. J. Treatment of haemophilia and related disorders in Britain and Northern Ireland during 1976-80: report on behalf of the directors of haemophilia centres in the United Kingdom. **BMJ**, v.286, p.929–933, 1983.

SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature Reviews Immunology**, v.10, p.170–181, 2010.

SUN, J.; YUAN, Z.; ABAJAS, Y. L.; SZOLLOSI, D. E.; HU, G.; HUA, B.; XIAO, X.; LI, C. A Retrospective Study of the Cytokine Profile Changes in Mice with FVIII Inhibitor Development After Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Therapy in a Hemophilia A Mouse Model. **Human Gene Therapy**, v.29, p.381–389, 2018.

VAN HELDEN, P. M. W.; VAN DEN BERG, H. M.; GOUW, S. C.; KAIJEN, P. H. P.; ZUURVELD, M. G.; MAUSER-BUNSCHOTEN, E. P.; AALBERSE, R. C.; VIDARSSON, G.; VOORBERG, J. IgG subclasses of anti-FVIII antibodies during immune tolerance induction in patients with hemophilia A: Anti-factor VIII IgG Subclasses During ITI. **British Journal of Haematology**, v.142, p.644–652, 2008.

VERBRUGGEN, B.; NOVAKOVA, I.; WESSELS, H.; BOEZEMAN, J.; VAN DEN BERG, M.; MAUSER-BUNSCHOTEN, E. The Nijmegen modification of Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. **Thrombosis and Haemostasis**, v.73, p.247-51, 1995

VERBRUGGEN, B.; VAN HEERDE, W.; NOVÁKOVÀ, I.; LILLICRAP, D.; GILES, A. A 4% Solution of Bovine Serum Albumin May Be Used in Place of Factor VIII:C Deficient Plasma in the Control Sample in the Nijmegen Modification of the Bethesda Factor VIII:C Inhibitor Assay. **Thrombosis and Haemostasis**, v.88, p.362–364, 2002.

WHELAN, S. F. J.; HOFBAUER, C. J.; HORLING, F. M.; ALLACHER, P.; WOLFSEGGER, M. J.; OLDENBURG, J.; MALE, C.; WINDYGA, J.; TIEDE, A.; SCHWARZ, H. P.; SCHEIFLINGER, F.; REIPERT, B. M. Distinct characteristics of antibody responses against factor VIII in healthy individuals and in different cohorts of hemophilia A patients. **Blood**, v.121, p.1039–1048, 2013.

ZERRA, P. E.; COX, C.; BALDWIN, W. H.; PATEL, S. R.; ARTHUR, C.; LOLLAR, P.; MEEKS, S.; STOWELL, S. R. Marginal zone B cells are critical to factor VIII inhibitor formation in mice with hemophilia A. **Blood**, v.130, p.2559–2568, 2017.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nós mostramos que as citocinas pró-inflamatórias e as subclasses IgG1 e IgG4 estavam aumentadas em PHA com inibidores e reduzidas em PHA sem inibidores após a exposição ao FVIII. Nossos resultados sugerem que o FVIII atua modulando seletivamente o sistema imunológico alterando a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, levando a um aumento de IgG1 e IgG4 anti-FVIII em PHA com inibidores. As quimiocinas parecem ser os elementos-chave que diferenciam os grupos INB- e INB+ durante as primeiras exposições ao FVIII.

7. REFERÊNCIAS

AGOSTINI, D.; ROSSET, C.; BOTTON, M. R.; KAPPEL, D. B.; VIEIRA, I. A.; GORZIZA, R. P.; SALZANO, F. M.; BANDINELLI, E. Immune system polymorphisms and factor VIII inhibitor formation in Brazilian haemophilia A severe patients. **Haemophilia**, v.18, p.e416–e418, 2012.

ANANYEVA, N. Catabolism of the Coagulation Factor VIII Can We Prolong Lifetime of f VIII in Circulation? **Trends in Cardiovascular Medicine**, v.11, p.251–257, 2001.

ANTONARAKIS, S. E.; ROSSITER, J. P.; YOUNG, M.; HORST, J.; DE MOERLOOSE, P.; SOMMER, S. S.; KETTERLING, R. P.; KAZAZIAN, H. H.; NÉGRIER, C.; VINCIGUERRA, C.; GITSCHIER, J.; GOOSSENS, M.; GIRODON, E.; GHANEM, N.; PLASSA, F.; LAVERGNE, J. M.; VIDAUD, M.; COSTA, J. M.; LAURIAN, Y.; LIN, S. W.; LIN, S. R.; SHEN, M. C.; LILLICRAP, D.; TAYLOR, S. A.; WINDSOR, S.; VALLEIX, S. V.; NAFA, K.; SULTAN, Y.; DELPECH, M.; VNENCAK-JONES, C. L.; PHILLIPS, J. A.; LJUNG, R. C.; KOUMBARELIS, E.; GIALERAKI, A.; MANDALAKI, T.; JENKINS, P. V.; COLLINS, P. W.; PASI, K. J.; GOODEVE, A.; PEAKE, I.; PRESTON, F. E.; SCHWARTZ, M.; SCHEIBEL, E.; INGERSLEV, J.; COOPER, D. N.; MILLAR, D. S.; KAKKAR, V. V.; GIANNELLI, F.; NAYLOR, J. A.; TIZZANO, E. F.; BAIGET, M.; DOMENECH, M.; ALTISENT, C.; TUSELL, J.; BENEYTO, M.; LORENZO, J. I.; GAUCHER, C.; MAZURIER, C.; PEERLINCK, K.; MATTHIJS, G.; CASSIMAN, J. J.; VERMYLEN, J.; MORI, P. G.; ACQUILA, M.; CAPRINO, D.; INABA, H. Factor VIII Gene Inversions in Severe Hemophilia. **Blood**, v.86, p.2206–2212, 1995.

ASTERMARK, J. 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.3167–3172, 2006a.

ASTERMARK, J. Why do inhibitors develop? Principles of and factors influencing the risk for inhibitor development in haemophilia. **Haemophilia**, v.12 p.52–60, 2006b.

ASTERMARK, J.; DONFIELD, S. M.; GOMPERTS, E. D.; SCHWARZ, J.; MENIUS, E. D.; PAVLOVA, A.; OLDENBURG, J.; KESSING, B.; DIMICHELE, D. M.; SHAPIRO, A. D.; WINKLER, C. A.; BERNTORP, E.; HEMOPHILIA INHIBITOR GENETICS STUDY (HIGS) COMBINED COHORT. The polygenic nature of inhibitors in hemophilia A: results from the Hemophilia Inhibitor Genetics Study (HIGS) Combined Cohort. **Blood**, v.121, p.1446–1454, 2013.

ASTERMARK, J. FVIII inhibitors: pathogenesis and avoidance. **Blood**, v.125, p.2045–2051, 2015.

BARKOFF, A. M.; GRONDAHL-YLI-HANNUKSELA, K.; VUONONVIRTA, J.; MERTSOLA, J.; KALLONEN, T.; HE, Q. Differences in avidity of IgG antibodies to pertussis toxin after acellular pertussis booster vaccination and natural infection. **Vaccine**, v.30, p.6897-902, 2012.

BAYRY, J.; LACROIX-DESMAZES, S.; PASHOV, A.; STAHL, D.; HOEBEKE, J.; KAZATCHKINE, M.D.; KAVERI, S.V. Autoantibodies to factor VIII with catalytic activity. **Autoimmunity Reviews**, v.2, p.30–35, 2003.

BECKER, R. C. Cell-Based Models of Coagulation: A Paradigm in Evolution. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v.20, p.65–68, 2005.

BERNTORP, E.; ASTERMARK, J.; BJÖRKMAN, S.; BLANCHETTE, V. S.; FISCHER, K.; GIANGRANDE, P. L.; GRINGERI, A.; LJUNG, R. C.; MANCO-JOHNSON, M. J.; MORFINI, M.; KILCOYNE, R. F.; PETRINI, P.; RODRIGUEZ-MERCHAN, E. C.; SCHRAMM, W.;

- SHAPIRO, A.; VAN DEN BERG, H. M.; HART, C. Consensus perspectives on prophylactic therapy for haemophilia: summary statement. **Haemophilia**, v.9, p.1–4, 2003.
- BOWEN, D. J. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. **Journal of Clinical Pathology - Molecular Pathology**, v.55, p.1-18, 2002.
- BROZE, G. J. JR. Tissue factor pathway inhibitor and the current concept of blood coagulation. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, v.6(1), p.S7-13, 1995.
- CALVEZ, T.; CHAMBOST, H.; CLAEYSSSENS-DONADEL.; D'OIRON, R.; GOULET, V.; GUILLET, B.; HERITIER, V.; MILIEN, V., ROTHSCHILD, C.; ROUSSEL-ROBERT. Recombinant factor VIII products and inhibitor development in previously untreated boys with severe hemophilia A. **Blood**, v.124, p.3398–3408, 2014.
- CALVEZ, T.; CHAMBOST, H.; D'OIRON, R.; DALIBARD, V.; DEMIGUEL, V.; DONCARLI, A.; GRUEL, Y.; HUGUENIN, Y.; LUTZ, P.; ROTHSCHILD, C.; VINCIGUERRA, C.; GOUDMAND, J.; FOR FRANCECOAG COLLABORATOR. Analyses of the FranceCoag cohort support differences in immunogenicity among one plasma-derived and two recombinant factor VIII brands in boys with severe hemophilia A. **Haematologica**, v.103, p.179–189, 2018.
- CAO, O.; LODUCA, P. A.; HERZOG, R. W. Role of regulatory T cells in tolerance to coagulation factors. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.7, p.88–91, 2009.
- CARAM, C.; SOUZA, R. G.; SOUSA, J. C.; PEREIRA, T. A.; CERQUEIRA, A. M.; VAN DER BOM, J.; REZENDE, S. M. The long-term course of factor VIII inhibitors in patients with congenital haemophilia A without immune tolerance induction. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.105, p.59-65, 2011.
- CASTRO, H. E.; BRICEÑO, M. F.; CASAS, C. P.; RUEDA, J. D. The History and Evolution of the Clinical Effectiveness of Haemophilia Type A Treatment: A Systematic Review. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v.30, p.1–11, 2014.
- CHARO, I. F.; RANSOHOFF, R. M. The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. **New England Journal of Medicine**, v.354, p.610–621, 2006.
- CHAVES, D. G.; RODRIGUES, C. V. Reactivity profile of anti-factor VIII antibodies with designed synthetic peptides mimicking epitopes of the C2 and a1 domains. **British Journal of Haematology**, v.141, p.708–715, 2008.
- CHAVES, D. G.; BELISÁRIO, A. R.; CASTRO, G. SANTORO, M. P.; RODRIGUES, C. V. Analysis of cytokine genes polymorphism as markers for inhibitor development in haemophilia A. **International Journal of Immunogenetics**, v.37, p.79–82, 2010a.
- CHAVES, D. G.; RODRIGUES, C. V.; OLIVEIRA, C. A.; TEIXEIRA, C.; SANTORO, M. M; MARTINS-FILHO, O. 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: Cytokine profile and anti-FVIII inhibitors in haemophilia A. **Clinical & Experimental Immunology**, v.162, p.425–437, 2010b.
- COLLINS, P. W.; PALMER, B. P.; CHALMERS, E. A.; HART, D. P; LIESNER, R.; RANGARAJAN, S.; TALKS, K.; WILLIAMS, M.; HAY, C. R. M.; ON BEHAL OF THE UK HAEMOPHILIA CENTRE DOCTORS' ORGANIZATION. Factor VIII brand and the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated UK children with severe hemophilia A, 2000-2011. **Blood**, v.124, p.3389–3397, 2014.

DARBY, S. C.; KEELING, D. M.; SPOONER, R. J. D.; WAN KAN, S.; GIANGRANDE, P. L. P.; COLLINS, P. W.; HILL, F. G. H.; HAY, C. R. M.; UK HAEMOPHILIA CENTRE DOCTORS' ORGANIZATION. The incidence of factor VIII and factor IX inhibitors in the hemophilia population of the UK and their effect on subsequent mortality, 1977-99: Inhibitors and mortality in hemophilia. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.2, p.1047–1054, 2004.

DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**, v.145, p.1310-2, 1964.

DESHMANE, S. L.; KREMLEV, S.; AMINI, S.; SAWAYA, B. E. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v.29, p.313–326, 2009.

DIAZ, I.; BOLLORÉ, K.; TUAILLON, E.; LAPALUD, P.; GIANSILY-BLAIZOT, M.; VENDRELL, J. P.; SCHVED, J. F.; LAVIGNE-LISSALDE, G. Circulating FVIII-specific IgG, IgA and IgM memory B cells from haemophilia A patients. **Haemophilia**, v.22, p.799–805, 2016.

DIMICHELE, D. M. Inhibitors in haemophilia: a primer. **Haemophilia**, v.6, p.38-40, 2000.

DIMICHELE, D. M. Inhibitors: resolving diagnostic and therapeutic dilemmas. **Haemophilia**, v.8, p.280–287, 2002.

EHRENFORTH, S.; KREUZ, W.; SCHARRER, I.; LINDE, R.; FUNK, M.; GUNGOR, T.; KRACKHARDT, B.; KORNHUBER, B. Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs. **Lancet**, v.339, p.594-8, 1992.

FANG, H.; WANG, L.; WANG, H. The protein structure and effect of factor VIII. **Thrombosis Research**, v.119, p.1–13, 2007.

FAY, P. J. Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. **Blood Reviews**, v.18, p.1–15, 2004.

FERREIRA, C. N.; SOUSA, M. O.; DUSSE, L. M.; CARVALHO, M. G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.32, p.416–421, 2010.

FISCHER, K.; STEEN CARLSSON, K.; PETRINI, P.; HOLMSTRÖM, M.; LJUNG, R.; VAN DEN BERG, H. M.; BERNTORP, E. Intermediate-dose versus high-dose prophylaxis for severe hemophilia: comparing outcome and costs since the 1970s. **Blood**, v.122, p.1129–1136, 2013.

GARAGIOLA, I.; PALLA, R.; PEYVANDI, F. Risk factors for inhibitor development in severe hemophilia A. **Thrombosis Research**, v.168, p.20–27, 2018.

GITSCHIER, J.; WOOD, W. I.; GORALKA, T. M.; WION, K. L.; CHEN, E. Y.; EATON, D. H.; VEHAR, G. A.; CAPON, D. J.; LAWN, R. M. Characterization of the human factor VIII gene. **Nature**, v.312, p.326-30, 1984.

GOODEVE, A. C.; PEAKE, I. R. The Molecular Basis of Hemophilia A: Genotype-Phenotype Relationships and Inhibitor Development. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v.29, p.023–030, 2003.

GOUDEMANT, J. 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, p.46–51, 2006.

GOUW, S. C.; VAN DER BOM, J. G.; AUERSWALD, G.; ETTINGHAUSEN, C.; TEDGARD, U.; VAN DEN BERG, H. M. FOR THE CANAL STUDY GROUP. Recombinant versus 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.4693–4697, 2007.

GOUW, S. C.; VAN DEN BERG, H. M.; OLDENBURG, J.; ASTERMARK, J.; DE GROOT, P. G.; MARGAGLIONE, M.; THOMPSON, A. R.; VAN HEERDE, W.; BOEKHORST, J.; MILLER, C. H.; LE CESSIE, S.; VAN DER BOM, J. G. F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. **Blood**, v.119, p.2922–2934, 2012.

GOUW, S. C.; VAN DEN BERG, H. M.; 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, R. P.; MANCUSO, M. E.; RAFOWICZ, A.; WILLIAMS, M.; CLAUSEN, N.; MIDDELBURG, R. A.; LJUNG, R.; VAN DER BOM, J. G.; 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**, v.121(20), p.4046–55, 2013.

GRAW, J.; BRACKMANN, H. H.; OLDENBURG, J.; SCHNEPPENHEIM, R.; SPANNAGL, M.; SCHWAAB, R. Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. **Nature Reviews Genetics**, v.6, p.488–501, 2005.

HA, H.; DEBNATH, B.; NEAMATI, N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases. **Theranostics**, v.7, p.1543–1588, 2017.

HAY, C. R. M.; OLLIER, W.; PEPPER, L.; CUMMING, A.; KEENEY, S.; GOODEVE, A. C.; COLVIN, B. T.; HILL, F. G.; PRESTON, F. E.; PEAKE, I. R. HLA class II profile: a weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe haemophilia A. UKHCDO Inhibitor Working Party. **Thrombosis and Haemostasis**, v.77, p.234–237, 1997.

HEDMAN, K.; ROUSSEAU, S. A. Measurement of avidity of specific IgG for verification of recent primary rubella. **Journal of Medical Virology**, v.27, p.288–292, 1989.

HEDNER, U. Congenital Hemorrhagic Disorders: New Insights into the Pathophysiology and Treatment of Hemophilia. **Hematology**, v.2000, p.241–265, 2000.

HILL-EUBANKS, D. C.; PARKER, C. G.; LOLLAR, P. Differential proteolytic activation of factor VIII-von Willebrand factor complex by thrombin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.86, p.6508–6512, 1989.

HOFFMAN, M. Remodeling the Blood Coagulation Cascade. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v.16, p.17–20, 2003.

HOFFMAN, M.; MONROE, D. A Cell-based Model of Hemostasis. **Thrombosis and Haemostasis**, v.85, p.958–965, 2001.

HU, G.; GUO, D.; KEY, N. S.; CONTI-FINE, B. M. Cytokine production by CD4+ T cells specific for coagulation factor VIII in healthy subjects and haemophilia A patients. **Thrombosis and Haemostasis**, v.97, p.788–794, 2007.

HUBER, A.; KUNKEL, S.; TODD, R.; WEISS, S. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. **Science**, v.254, p.99–102, 1991.

JARDIM, L. L.; . Immune status of patients with haemophilia A before exposure to factor VIII: first results from the HEMFIL study. **British Journal of Haematology**, v. 178, n. 6, p. 971–978, set. 2017.

KASPER, C. K.; ALEDORT, L.; ARONSON, D.; COUNTS, R.; EDSON, J. R.; VANEYS, J.; FRATANTONI, J.; GREEN, D.; HAMPTON, J.; HILGARTNER, M.; LEVINE, P.; LAZERSON, J.; MCMILLAN, C.; PENNER, J.; SHAPIRO, S.; SHULMAN, N. R. Proceedings: A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. **Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica**, v.34(2), p.612, 1975.

KOCH, A.; POLVERINI, P.; KUNKEL, S.; HARLOW, L.; DIPIETRO, L.; ELNER, V.; ELNER, S.; STRIETER, R. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. **Science**, v.258, p.1798–1801, 1992.

LAI, J. D.; LILLICRAP, D. Factor VIII inhibitors: Advances in basic and translational science. **International Journal of Laboratory Hematology**, v.39, p.6–13, 2017.

LAVIGNE-LISSALDE, G.; SCHVED, J. F.; GRANIER, C.; VILLARD, S. Anti-factor VIII antibodies: a 2005 update. **Thrombosis and Haemostasis**, v.94, p.760-9, 2005.

LAVIGNE-LISSALDE, G.; ROTHCHILD, C.; POUPLARD, C.; LAPALUD, P.; GRUEL, Y.; SCHVED, J. F.; GRANIER, C. Characteristics, Mechanisms of Action, and Epitope Mapping of Anti-factor VIII Antibodies. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v.37, p.67–79, 2009.

LEISSINGER, C.; COOPER, D. L.; SOLEM, C. T.; ON BEHALF OF THE HTRS INVESTIGATORS. Assessing the impact of age, race, ethnicity and inhibitor status on functional limitations of patients with severe and moderately severe haemophilia A: AGE, INHIBITORS AND FUNCTIONAL LIMITATIONS. **Haemophilia**, v.17, p.884–889, 2011.

LENTING, P. J.; VAN MOURIK, J. A.; MERTENS, K. The Life Cycle of Coagulation Factor VIII in View of Its Structure and Function. **Blood**, v.92, p.3983-96, 1998.

LEVINSON, B.; BERMINGHAM, JR.; METZENBERG, A.; KENWRICK, S.; CHAPMAN, V.; GITSCHIER, J. Sequence of the human factor VIII-associated gene is conserved in mouse. **Genomics**, v.13, p.862–865, 1992.

LEWIS, K. B.; HUGHES, R. J.; EPSTEIN, M. S.; JOSEPHSON, N. C.; KEMPTON, C. L.; KESSLER, C. M.; KEY, N. S.; HOWARD, T. E.; KRUSE-JARRES, R.; LUSHER, J. M.; WALSH, C. E.; WATTS, R. G.; ETTINGER, R. A.; PRATT, K. P.; THE PATH (PERSONALIZED ALTERNATIVE THERAPIES FOR HAEMOPHILIA) STUDY INVESTIGATORS. Phenotypes of Allo- and Autoimmune Antibody Responses to FVIII Characterized by Surface Plasmon Resonance. **PLoS ONE**, v.8, p.e61120, 2013.

LILLICRAP, D.; FIJNVANDRAAT, K.; SANTAGOSTINO, E. Inhibitors - genetic and environmental factors. **Haemophilia**, v.20, p.87–93, 2014.

LOLLAR, P. Pathogenic antibodies to coagulation factors. Part one: Factor VIII and Factor IX: Pathogenic antibodies to coagulation factors. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.2, p.1082–1095, 2004.

LOZIER, J. N.; ROSENBERG, P. S; GOEDERT, J. J.; MENASHE, I. A case-control study reveals immunoregulatory gene haplotypes that influence inhibitor risk in severe haemophilia A: IMMUNOGENETICS OF FACTOR VIII INHIBITORS. **Haemophilia**, v.17, p.641–649, 2011.

- LUSTER, A. D. Chemokines — Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation. **New England Journal of Medicine**, v.338, p.436–445, 1998.
- MACFARLANE, R. G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. **Nature**. v.202, p.498-9, 1964.
- MAZURKIEWICZ-PISAREK, A.; PLUCIENNICZAK, G.; CIACH, T.; PLUCIENNICZAK, A. The factor VIII protein and its function. **Acta Biochimica Polonica**, v.63, p.11–16, 2016.
- MELO, K. M.; CARVALHO, B. T. C. Células T regulatórias: mecanismos de ação e função nas doenças humanas. **Rev. Bras. de alergia e imunopatologia**, v.3, p.294–301, 2009.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados. **Manual de diagnóstico laboratorial das coagulopatias hereditárias e plaquetopatias**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados. **Perfil das coagulopatias hereditárias no Brasil: 2014 / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015.**
- MONTALVÃO, S. A.; TUCUNDUVA, A. C.; SIQUEIRA, L. H.; SAMBO, A. L.; MEDINA, S. S.; OZELO, M. C. A longitudinal evaluation of anti-FVIII antibodies demonstrated IgG4 subclass is mainly correlated with high-titre inhibitor in haemophilia A patients. **Haemophilia**, v.21(5), p.686-92, 2015.
- MURPHY, K. M. T lymphocyte differentiation in the periphery. **Current Opinion in Immunology**, v.10, p.226-32, 1998.
- NGO, J. C. K.; HUANG, M.; ROTH, D. A.; FURIE, B. C.; FURIE, B. Crystal Structure of Human Factor VIII: Implications for the Formation of the Factor IXa-Factor VIIIa Complex. **Structure**, v.16, p.597–606, 2008.
- OLDENBURG, J.; PAVLOVA, A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. **Haemophilia**, v.12, p.15–22, 2006.
- OLIVEIRA, C. A.; VELLOSO-RODRIGUES, C.; MACHADO, F. C.; CARVALHO, B. N.; GENTZ, S. H.; MARTINS-FILHO, O. A.; CHAVES, D. G. Cytokine profile and FVIII inhibitors development in haemophilia A. **Haemophilia**, v.19, p.e139–e142, 2013.
- PANDEY, G. S.; YANOVER, C.; MILLER-JENKINS, L. M.; GARFIELD, S.; COLE, S. A.; CURRAN, J. E.; MOSES, E. K.; RYDZ, N.; SIMHADRI, V.; KIMCHI-SARFATY, C.; LILLICRAP, D.; VIEL, K. R.; PRZYTYCKA, T. M.; PIERCE, G. F.; HOWARD, T. E.; SAUNA, Z. E.; THE PATH (PERSONALIZED ALTERNATIVE THERAPIES FOR HAEMOPHILIA) STUDY INVESTIGATORS. Endogenous factor VIII synthesis from the intron 22-inverted F8 locus may modulate the immunogenicity of replacement therapy for hemophilia A. **Nature Medicine**, v.19, p.1318–1324, 2013.
- PELED, J. U.; FEI, L. K.; IGLESIAS-USSEL, M. D.; ROA, S.; KALIS, S. L.; GOODMAN, M. F.; SCHARFF, M. D. The biochemistry of somatic hypermutation. **Annual Review of Immunology**, v.26, p.481–511, 2008.
- PEYVANDI, F.; MANNUCCI, P. M.; GARAGIOLA, I.; EL-BESHLAWY, A.; ELALFY, M.; RAMANAN, V.; ESHGHI, P.; HANAGAVADI, S.; VARADARAJAN, R.; KARIMI, M.; MANGLANI, M. V.; ROSS, C.; YOUNG, G.; SETH, T.; APTE, S.; NAYAK, D. M.; SANTAGOSTINO, E.; MANCUSO, M. E.; SANDOVAL GONZA, A. C.; MAHLANGU, J. N.;

BONANAD BOIX, S.; CERQUEIRA, M.; EWING, N. P.; MALE, C.; OWALDAH, T.; SOTO ARELLANO, V.; KOBRINSKY, N. L.; MAJUMDAR, S.; PEREZ GARRIDO, R.; SACHDEVA, A.; SIMPSON, M.; THOMAS, M.; ZANON, E.; ANTMEN, B.; KAVAKLI, K.; MANCO-JOHNSON, M. J.; MARTINEZ, M.; MARZOUKA, E.; MAZZUCCONI, M. G.; NEME, D.; PALOMO BRAVO, A.; PAREDES AGUILERA, R.; PREZOTTI, A.; SCHIMITT, K.; WICKLUND, B. M.; ZULFIKAR, B.; ROSENDAAL, F. R. A Randomized Trial of Factor VIII and Neutralizing Antibodies in Hemophilia A. **New England Journal of Medicine**, v.374, p.2054–2064, 2016.

PIO, S. F.; OLIVEIRA, G. C. DE; REZENDE, S. M. As bases moleculares da hemofilia A. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.55, p.213–219, 2009.

PORDES, A. G.; BAUMGARTNER, C. K.; ALLACHER, P.; AHMAD, R. U.; WEILLER, M.; SCHIVIZ, A. N.; SCHWARZ, H. P.; REIPERT, B. M. T cell-independent restimulation of FVIII-specific murine memory B cells is facilitated by dendritic cells together with toll-like receptor 7 agonist. **Blood**, v.118, p.3154–3162, 2011.

PRATT, K. P.; SHEN, B. W.; TAKESHIMA, K.; DAVIE, E. W.; FUJIKAWA, K.; STODDARD, B. L. Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution. **Nature**, v.402, p.439–442, 1999.

PRELOG, M.; ALMANZAR, G.; RIEBER, N.; OTTENSMEIER, B.; ZLAMY, M.; LIESE, J. Differences of IgG antibody avidity after an acellular pertussis (aP) booster in adolescents after a whole cell (wcP) or aP primary vaccination. **Vaccine**, v.31, p.387-93, 2013.

PRESCOTT, R.; NAKAI, H.; SAENKO, E. L.; SCHARRER, I.; NILSSON, I. M.; HUMPHRIES, J. E.; HURST, D.; BRAY, G.; SCANDELLA, D. The Inhibitor Antibody Response Is More Complex in Hemophilia A Patients Than in Most Nonhemophiliacs With Factor VIII Autoantibodies. **Blood**, v.89, p.10, 1997.

QADURA, M.; WATERS, B.; BURNETT, E.; CHEGENI, R.; HOUGH, C.; OTHMAN, M.; LILLICRAP, D. Immunoglobulin isotypes and functional anti-FVIII antibodies in response to FVIII treatment in Balb/c and C57BL/6 haemophilia A mice: IMMUNE RESPONSES TO FVIII IN Balb/c AND C57BL/6 HAEMOPHILIC MICE. **Haemophilia**, v.17, p.288–295, 2011.

REDING, M. T.; LEI, S.; LEI, H.; GREEN, D.; GILL, J.; CONTI-FINE, B. M. Distribution of Th1- and Th2-induced Anti-factor VIII IgG Subclasses in Congenital and Acquired Hemophilia Patients. **Thrombosis and Haemostasis**, v.88, p.568–575, 2002.

REDING, M. T.; OKITA, D. K.; DIETHELM-OKITA, B. M.; ANDERSON, T. A.; CONTI-FINE, B.M. Human CD4+ T-cell epitope repertoire on the C2 domain of coagulation factor VIII. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.1, p.1777–1784, 2003.

RICK, M. E.; WALSH, C. E.; KEY, N. S. Congenital Bleeding Disorders. **Hematology - American Society of Hematology Educational Program**, p.16, 2003.

RIZZA, C. R.; SPOONER, R. J. Treatment of haemophilia and related disorders in Britain and Northern Ireland during 1976-80: report on behalf of the directors of haemophilia centres in the United Kingdom. **BMJ**, v.286, p.929–933, 1983.

RUSSO, R. C.; GARCIA, C. C.; TEIXEIRA, M. M.; AMARAL, F. A. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. **Expert Review of Clinical Immunology**, v.10, p.593–619, 2014.

SAENKO, E. L.; ANANYEVA, N. M.; TUDDENHAM, E. G. D.; KEMBALL-COOK, G. Factor VIII - novel insights into form and function. **British Journal of Haematology**, v.119, p.323–331, 2002.

SAENKO, E. L.; SCANDELLA, D. The Acidic Region of the Factor VIII Light Chain and the C2 Domain Together Form the High Affinity Binding Site for von Willebrand Factor. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.18007–18014, 1997.

SCHWAAB, R.; BRACKMANN, H. H.; MEYER, C.; SEEHAFFER, J.; KIRCHGESSER, M.; HAACK, A.; OLEK, K.; TUDDENHAM, E. G.; OLDENBURG, J. Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. **Thrombosis and Haemostasis**, v.74, p.1402-1406, 1995.

SILVEIRA, A. C.; SANTANA, M. A.; RIBEIRO, I. G.; CHAVES, D. G.; MARTINS-FILHO, O. A. The IL-10 polarized cytokine pattern in innate and adaptive immunity cells contribute to the development of FVIII inhibitors. **BMC Hematology**, v.15, 2015.

SOARES, R. P. S.; CHAMONE, D. A. F.; BYDLOWSKI, S. P. Factor VIII gene inversions and polymorphisms in Brazilian patients with haemophilia A: carrier detection and prenatal diagnosis. **Haemophilia**, v.7, p.299–305, 2001.

SUN, J; YUAN, Z.; ABAJAS, Y. L.; SZOLLOSI, D. E.; HU, G.; HUA, B.; XIAO, X.; LI, C. A Retrospective Study of the Cytokine Profile Changes in Mice with FVIII Inhibitor Development After Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Therapy in a Hemophilia A Mouse Model. **Human Gene Therapy**, v.29, p.381–389, 2018.

TAGARIELLO, G.; IORIO, A., MATINO, D.; BELVINI, D.; SALVIATO, R.; SARTORI, R.; RADOSSI, P. High rate of spontaneous inhibitor clearance during the long term observation study of a single cohort of 524 haemophilia A patients not undergoing immunotolerance. **Journal of Hematology & Oncology**, v.6, p.63, 2013.

TIEDE, A.; HOFBAUER, C. J.; WERWITZKE, S.; KNÖBL, P.; GOTTSTEIN, S.; SCHARF, R. E.; HEINZ, J.; GROSS, J.; HOLSTEIN, K.; DOBBELSTEIN, C.; SCHEIFLINGER, F.; KOCH, A.; REIPERT, B.M Anti-factor VIII IgA as a potential marker of poor prognosis in acquired hemophilia A: results from the GTH-AH 01/2010 study. **Blood**, v.127, p.2289–2297, 2016.

VAN HELDEN, P.M.W. et al. IgG subclasses of anti-FVIII antibodies during immune tolerance induction in patients with hemophilia A: Anti-factor VIII IgG Subclasses During ITI. **British Journal of Haematology**, v.142, p.644–652, 2008.

VERBRUGGEN, B.; NOVAKOVA, I.; WESSELS, H.; BOEZEMAN, J.; VAN DEN BERG, M.; MAUSER-BUNSCHOTEN, E. The Nijmegen modification of Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. **Thrombosis and Haemostasis**, v.73, p.247-51, 1995.

VERBRUGGEN, B.; VAN HEERDE, W.; NOVÁKOVÁ, I.; LILLICRAP, D.; GILES, A. A 4% solution of bovine serum albumin may be used in place of factor VIII:C deficient plasma in the control sample in the Nijmegen Modification of the Bethesda factor VIII:C inhibitor assay. **Thrombosis and Haemostasis**. v.88, p.3 62-4, 2002.

VERMONT, C. L.; VAN DIJKEN, H. H.; VAN LIMPT, C. J. P.; GROOT, R.; VAN ALPHEN, L.; VAN DEN DOBBELSTEEN, G. P. J. M. Antibody Avidity and Immunoglobulin G Isotype Distribution following Immunization with a Monovalent Meningococcal B Outer Membrane Vesicle Vaccine. **Infection and Immunity**, v.70, p.584-90, 2002.

VIEL, K. R.; AMERI, A.; ABSHIRE, T. C.; IYER, R.V.; WATTS, R. G.; LUTCHER, C.; CHANNELL, C.; COLE, S. A.; FERNSTROM, K.M.; NAKAYA, S.; KASPER, C. K.; THOMPSON, A. R.; ALMASY, L.; HOWARD, T. E. Inhibitors of Factor VIII in Black Patients with Hemophilia. **New England Journal of Medicine**, v.360, p.1618–1627, 2009.

WALSH, C. E.; SOUCIE, J. M.; MILLER, C. H.; THE UNITED STATES HEMOPHILIA TREATMENT CENTER NETWORK. Impact of inhibitors on hemophilia a mortality in the United States: Impact of Inhibitors on Hemophilia. **American Journal of Hematology**, v.90, p.400–405, 2015.

WATERS, B.; LILLICRAP, D. The molecular mechanisms of immunomodulation and tolerance induction to factor VIII. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.7, p.1446–1456, 2009.

WHELAN, S. F. J.; HOFBAUER, C. J.; HORLING, F. M.; ALLACHER, P.; WOLFSEGGGER, M. J.; OLDENBURG, J.; MALE, C.; WINDYGA, J.; TIEDE, A.; SCHWARZ, H. P.; SCHEIFLINGER, F.; REIPERT, B. M. Distinct characteristics of antibody responses against factor VIII in healthy individuals and in different cohorts of hemophilia A patients. **Blood**, v.121, p.1039–1048, 2013.

WIGHT, J.; PAISLEY, S. The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. **Haemophilia**, v.9, p.418–435, 2003.

ZERRA, P. E.; COX, C.; BALDWIN, W. H.; PATEL, S. R.; ARTHUR, C.; LOLLAR, P.; MEEKS, S.; STOWELL, S. R. Marginal zone B cells are critical to factor VIII inhibitor formation in mice with hemophilia A. **Blood**, v.130, p.2559–2568, 2017.

ANEXO 1

FUNDAÇÃO HEMOMINAS-MG



PROJETO DE PESQUISA

Título: Avaliação dos fatores clínicos, genéticos e imunológicos relacionados ao desenvolvimento de inibidores em hemofilia

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 05648412.2.0000.5118

Pesquisador: Daniel Gonçalves Chaves

Instituição: Fundação Hemominas-MG

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 91.890

Data da Relatoria: 06/09/2012

Apresentação do Projeto:

A hemofilia congênita é uma doença hemorrágica resultante da deficiência dos fatores VIII (hemofilia A) ou IX (hemofilia B) da coagulação, devido a alterações genéticas (mutações) nos genes que codificam estas proteínas. A maioria dos pacientes com hemofilia são imunologicamente não responsivos a infusão de fatores de coagulação (concentrados de fator VIII ou IX), isto é, eles não desenvolvem uma resposta imune clinicamente mensurável, capaz de inibir a atividade coagulante destes fatores. Em 10%-30% e 1%-5% dos pacientes com hemofilia A e B, respectivamente, uma resposta imune pode se desenvolver, levando ao desenvolvimento de inibidores (aloanticorpos). Isto ocasiona ineficácia da reposição de fator e graves complicações hemorrágicas. A fisiopatologia relacionada ao desenvolvimento de inibidores é pouco compreendida. Nos últimos anos, diversos fatores de risco têm sido apontados em associação com esta complicação. Entretanto, fatores de risco individuais não explicam a maioria dos casos, sendo possível que a associação de vários fatores de risco possa estar relacionada à fisiopatologia dos inibidores em hemofilia. O objetivo principal deste projeto é o de identificar potenciais fatores de risco relacionados ao desenvolvimento destes inibidores, expandindo a investigação para aspectos clínicos, imunológicos e genéticos. Para tal, será constituída uma coorte de pacientes com hemofilias A e B de diagnóstico recente. Os potenciais fatores de risco serão avaliados em dois tempos do estudo (ao diagnóstico da hemofilia e ao diagnóstico do inibidor). Os dois grupos de pesquisa envolvidos na proposta são atuantes na área e estudiosos do tema de inibidores em hemofilia, tendo produzido várias publicações no assunto nos últimos anos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral:

- Identificar os fatores clínicos, genéticos e imunológicos relacionados ao desenvolvimento de inibidores em hemofilia.

Objetivos Específicos:

- Determinar os fatores genéticos relacionados ao desenvolvimento e persistência de inibidores em hemofilia;
- Determinar os fatores não-genéticos (clínicos e imunológicos) relacionados ao desenvolvimento e persistência de inibidores em hemofilia;
- Avaliar a presença de fatores clínicos, genéticos e imunológicos em pacientes que desenvolveram inibidores em comparação com os que não desenvolveram.

Endereço: Alameda Ezequiel Dias. 321

Bairro: Santa Efigênia **CEP:** 30.130-110

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)248-4587

Fax: (31)248-4600

E-mail: cep@hemominas.mg.gov.br

ANEXO 2

Formulário 1: Avaliação inicial

Avaliação dos fatores clínicos,
imunológicos e genéticos
relacionados ao desenvolvimento
de inibidores em hemofilia
Estudo HEMFIL

Formulário 1 Avaliação Inicial

Código do centro:

página 1 de 6

ID do paciente:

Termo de consentimento assinado?

 Sim Não →

Atenção: Você não pode preencher
os dados sem que o paciente assine
o termo de consentimento

A. Características gerais

1. Data da avaliação inicial

2. Paciente (nome e sobrenome completo):

3. Data de nascimento

4. Sexo

 Masculino Feminino

5. Origem étnica (auto-definição)

 Branco Negro de origem africana Negro de outra origem Asiático OutroQual:

Local de nascimento do paciente:

 Brasil outro país.Qual:

Local de nascimento do pai:

 Brasil outro país.Qual:

Local de nascimento da mãe:

 Brasil outro país.Qual:

Local de nascimento do avô materno:

 Brasil outro país.Qual:

A. Características gerais (continuação)

Local de nascimento da avó materna:

Brasil
 outro país.

Qual:

Local de nascimento do avô paterno:

Brasil
 outro país.

Qual:

Local de nascimento da avó paterna:

Brasil
 outro país.

Qual:

6. Tipo de hemofilia

A
 B

7. Atividade residual do fator de coagulação

Grave (< 1%)
 Moderada (1% a 5%)
 Leve (>5% a 25%)

Dosagem de atividade

FVIII / IX:C

FVIII/IX:Ag

% Data:

% ou não conhecido/ não dosado

8. Possui irmão gêmeo com a mesma deficiência?

Sim
 Não

9. Grupo sanguíneo

A
 B
 O
 AB
 Não conhecido. Neste caso, após realização deste teste, preencher o campo A.1 no formulário 2 de atualização

10. Mutação conhecida?

Sim
 Não

Se sim, inversão do intron 22

Sim
 Não. Anexar cópia do diagnóstico molecular (registro de acordo com o HAMSTer database)

B. Histórico médico do paciente

1. Tipo de parto

- Normal (preencher o item B1a)
 Cesariana (preencher o item B1b)
 Não sabe ou não informa (ir para B2)

a. Se parto normal

- Natural
 Fórceps
 Vácuo-extrator
 Não sabe ou não informa

b. Se cesariana: por causa da hemofilia?

- Sim
 Não
 Não sabe ou não informa

2. Idade da gestação no momento do parto

- semanas
 Não sabe ou não informa

3. A mãe necessitou de hemoderivados e/ou hemocomponentes durante o parto do paciente?

- Sim
 Não
 Não sabe ou não informa

4. O paciente recebeu hemoderivados e/ou hemocomponentes no primeiro mês de vida?

- Sim
 Não
 Não sabe ou não informa

5. Paciente apresentou sangramentos anormais na primeira semana após o nascimento?

- Sim
 Não
 Não sabe ou não informa

6. Paciente apresentou sangramento intracraniano na primeira semana após o nascimento?

- Sim
 Não
 Não sabe ou não informa

a. Se sim, sintomático?

- Sim
 Não i.e. descoberto com ultrassom de rotina
 Não sabe ou não informa

B. Histórico médico (continuação)

7. Tempo de amamentação exclusiva

semanas

- Amamentação ainda em andamento. Neste caso, após suspensão da amamentação, preencher o campo A.3 no formulário 2 de atualização
- Não sabe ou não informa

8. Data do diagnóstico da hemofilia

9. Motivo do diagnóstico

- Histórico familiar
- Sangramento
- Outro. Especificar:
- Não sabe ou não informa

10. Outras coagulopatias associadas

- Sim. Especificar:
- Não
- Não sabe ou não informa

11. Outras doenças que podem interferir com o prognóstico do paciente

- Sim. Especificar:
- Não
- Não sabe ou não informa

12. Foi realizada circuncisão?

- Sim Data:
- Não (Ir para o item C1)
- Não sabe ou não informa

a. Foi utilizada cola de fibrina?

- Sim
- Não
- Não sabe ou não informa

Para infecções, alergias, medicação e vacinação favor preencher o formulário 3 "Dados imunológicos até o 75º dia de exposição".

Formulário 1 Avaliação Inicial

Código do centro:

página 5 de 6

ID do paciente:

C. Histórico familiar

1. História familiar de hemofilia? Sim. Quem?
 Não
 Não sabe ou não informa
2. Diagnóstico pré-natal durante a gravidez? Sim
 Não
 Não sabe ou não informa
3. Número de irmãos (sexo masculino) do paciente (preencha com "0" se não há ou se não se sabe) com hemofilia
 sem hemofilia
 status desconhecido
4. Número de irmãs do paciente (preencha com "0" se não há ou se não se sabe) portadoras
 não portadoras
 status desconhecido
5. Membros da família (pais, irmãos, irmãs) com inibidor (atual ou diagnóstico passado) Sim, número total de . Quem?
 Não
 Não sabe ou não informa

D. Tratamento

1. O paciente está recebendo infusões de concentrado de fator ou já recebeu infusões? Sim, preencha o formulário 4 "Primeiros 75 dias de exposição"
 Não
2. Recomendação de tratamento até a próxima consulta Sob demanda
 Profilaxia
 Imunotolerância
- Se profilaxia:
- a. Dose por dia UI/mg
- b. Frequência por semana vezes por semana
- c. Ou outra
- d. Dose inicial para sangramento menor*: UI/mg
- e. Dose inicial após sangramento maior**: UI/mg
- f. Dose inicial após trauma grave: UI/mg

* Sangramento menor: dor leve, inchaço mínimo, mínima restrição de movimento, melhora dentro de 24 horas após o tratamento.

** Sangramento maior: dor, edema, limitação de movimento, falha de resposta em 24 horas de tratamento.

Formulário 1 Avaliação Inicial

Código do centro:

página 6 de 6

ID do paciente:

D. Tratamento (continuação)

g. Nome do produto *Se o nome do produto for diferente, especificar:* h. Tratamento adicional

3. Peso (Kg):

, Kg

4. Observações e heredograma

ANEXO 3

Formulário 2: Formulário de atualização

Avaliação dos fatores clínicos,
imunológicos e genéticos
relacionados ao desenvolvimento
de inibidores em hemofilia
Estudo HEMFIL

Formulário 2
Formulário de atualizaçãoCódigo do centro:

página 1 de 1

ID do paciente: **A. Formulário de atualização**

1. Grupo sanguíneo:

- A
 B
 O
 AB

2. Mutação conhecida:

- Sim
 Não

Se sim, intron 22?

- Sim
 Não. Anexar cópia do diagnóstico molecular.

3. Duração de aleitamento materno exclusivo

 semanas

ANEXO 4

Formulário 3: Dados imunológicos até o 75º dia de exposição

Avaliação dos fatores clínicos, imunológicos e genéticos relacionados ao desenvolvimento de inibidores em hemofilia
Estudo HEMFIL

Formulário 3
Dados imunológicos até o 75º dia de exposição

Código do centro:

página 1 de 3

ID do paciente:

1. Data da avaliação inicial ou da visita de acompanhamento

<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Dia	Mês	Ano			

Período descrito

Para avaliação inicial: registrar os dados de pelo menos 2 meses antes da primeira administração de fator de coagulação.

Visita de acompanhamento: registrar os dados do último formulário preenchido até a data mencionada acima.

2. Durante o período descrito, a criança foi tratada para:

a. Infecção aguda do trato respiratório

- Sim Número de vezes
- Não
- Não sabe ou não informa

Data de início da	Dia	Mês	Ano
Última vez	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Penúltima vez	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Antepenúltima vez	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

b. Otite média aguda

- Sim Número de vezes
- Não
- Não sabe ou não informa

Data de início da	Dia	Mês	Ano
Última vez	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Penúltima vez	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Antepenúltima vez	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

c. Bronquite / bronquiolite

- Sim Número de vezes
- Não
- Não sabe ou não informa

Data de início da	Dia	Mês	Ano
Última vez	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Penúltima vez	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Antepenúltima vez	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

d. Pneumonia

- Sim Número de vezes
- Não
- Não sabe ou não informa

Data de início da	Dia	Mês	Ano
Última vez	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Penúltima vez	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Antepenúltima vez	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

e. Gripe forte

- Sim Número de vezes
- Não
- Não sabe ou não informa

Data de início da	Dia	Mês	Ano
Última vez	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Penúltima vez	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Antepenúltima vez	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

f. Outras infecções que as não mencionadas acima, especificar:

- Sim Número de vezes
- Não
- Não sabe ou não informa

Data de início da	Dia	Mês	Ano
Última vez	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Penúltima vez	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Antepenúltima vez	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

A questão 2 continua na próxima página

Se uma das respostas às questões 2a a 2f foi positiva, responder os itens 2g e 2h

2g. A criança consultou um pediatra ou
otorrinolaringologista devido às infecções
no trato respiratório? Sim
 Não

2h. Quantas vezes a criança foi internada
devido a problemas no trato respiratório? vezes

3. Durante o período descrito, o paciente desenvolveu:

a. Alergia/Atopia (incluindo asma) Sim
 Não

b. Alergia ao leite de vaca Sim
 Não

c. Outras doenças crônicas (com duração > 3 meses) Sim Especifique:
 Não

4. Histórico de alergia na família

Alguns dos pais, irmãos ou irmãs desenvolveu alergia/
atopia (incluindo asma) no período descrito? Sim
 Não
 Não sabe ou não informa

5. Medicação utilizada no período descrito

(apenas para alergia/atopia, incluindo asma ou
analgésicos ou antibióticos)

- Sim, descrito na tabela
 Não (ir para a questão 6)
 Não sabe ou não informa (ir para a questão 6)

Nome do medicamento Data de início do tratamento
Indicação Data do fim do tratamento Ainda em andamento

Nome do medicamento Data de início do tratamento
Indicação Data do fim do tratamento Ainda em andamento

Nome do medicamento Data de início do tratamento
Indicação Data do fim do tratamento Ainda em andamento

Nome do medicamento Data de início do tratamento
Indicação Data do fim do tratamento Ainda em andamento

6. Vacinações durante o período descrito:

- Sim, descrito na tabela
 Não
 Não sabe ou não informa

Tipo de vacinação <input type="text"/>	Data da vacinação <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Reações adversas, se relatadas <input type="text"/>	Modo de vacinação <input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Intramuscular <input type="checkbox"/> Desconhecido
Tipo de vacinação <input type="text"/>	Data da vacinação <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Reações adversas, se relatadas <input type="text"/>	Modo de vacinação <input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Intramuscular <input type="checkbox"/> Desconhecido
Tipo de vacinação <input type="text"/>	Data da vacinação <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Reações adversas, se relatadas <input type="text"/>	Modo de vacinação <input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Intramuscular <input type="checkbox"/> Desconhecido
Tipo de vacinação <input type="text"/>	Data da vacinação <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Reações adversas, se relatadas <input type="text"/>	Modo de vacinação <input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Intramuscular <input type="checkbox"/> Desconhecido
Tipo de vacinação <input type="text"/>	Data da vacinação <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Reações adversas, se relatadas <input type="text"/>	Modo de vacinação <input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Intramuscular <input type="checkbox"/> Desconhecido
Tipo de vacinação <input type="text"/>	Data da vacinação <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Reações adversas, se relatadas <input type="text"/>	Modo de vacinação <input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Intramuscular <input type="checkbox"/> Desconhecido
Tipo de vacinação <input type="text"/>	Data da vacinação <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Reações adversas, se relatadas <input type="text"/>	Modo de vacinação <input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Intramuscular <input type="checkbox"/> Desconhecido
Tipo de vacinação <input type="text"/>	Data da vacinação <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Reações adversas, se relatadas <input type="text"/>	Modo de vacinação <input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Intramuscular <input type="checkbox"/> Desconhecido
Tipo de vacinação <input type="text"/>	Data da vacinação <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Reações adversas, se relatadas <input type="text"/>	Modo de vacinação <input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Intramuscular <input type="checkbox"/> Desconhecido

7. Total de "dias de risco" neste período de acompanhamento

dias

ANEXO 5

Formulário 4: Primeiros 75 dias de exposição

Avaliação dos fatores clínicos, imunológicos e genéticos relacionados ao desenvolvimento de inibidores em hemofilia
Estudo HEMFIL

Formulário 4 Primeiros 75 dias de exposição

Data da visita:
Dia Mês Ano

Código do centro: página 1 de 1
ID do paciente:

Data do tratamento	Nº do dia de exposição	Motivo do tratamento	Se sangramento			Fator de coagulação			Observações se recombinante (R), plasmático (P), infusão contínua (IC)
			Localização*	Lado	Gravidade**	Número total de unidades no dia	Nome do produto	Possível extravasamento do fator	
<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> Dia Mês Ano	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> Profilaxia <input type="checkbox"/> Sangramento <input type="checkbox"/> Cirurgia (Pré + Pós) <input type="checkbox"/> Trauma craniano (TC) <input type="checkbox"/> Seguimento do tratamento	<input type="checkbox"/> Direito <input type="checkbox"/> Esquerdo <input type="checkbox"/> Desconhecido	<input type="checkbox"/> Menor <input type="checkbox"/> Maior	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Desconhecido	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> Dia Mês Ano	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> Profilaxia <input type="checkbox"/> Sangramento <input type="checkbox"/> Cirurgia (Pré + Pós) <input type="checkbox"/> Trauma craniano (TC) <input type="checkbox"/> Seguimento do tratamento	<input type="checkbox"/> Direito <input type="checkbox"/> Esquerdo <input type="checkbox"/> Desconhecido	<input type="checkbox"/> Menor <input type="checkbox"/> Maior	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Desconhecido	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> Dia Mês Ano	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> Profilaxia <input type="checkbox"/> Sangramento <input type="checkbox"/> Cirurgia (Pré + Pós) <input type="checkbox"/> Trauma craniano (TC) <input type="checkbox"/> Seguimento do tratamento	<input type="checkbox"/> Direito <input type="checkbox"/> Esquerdo <input type="checkbox"/> Desconhecido	<input type="checkbox"/> Menor <input type="checkbox"/> Maior	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Desconhecido	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> Dia Mês Ano	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> Profilaxia <input type="checkbox"/> Sangramento <input type="checkbox"/> Cirurgia (Pré + Pós) <input type="checkbox"/> Trauma craniano (TC) <input type="checkbox"/> Seguimento do tratamento	<input type="checkbox"/> Direito <input type="checkbox"/> Esquerdo <input type="checkbox"/> Desconhecido	<input type="checkbox"/> Menor <input type="checkbox"/> Maior	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Desconhecido	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> Dia Mês Ano	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> Profilaxia <input type="checkbox"/> Sangramento <input type="checkbox"/> Cirurgia (Pré + Pós) <input type="checkbox"/> Trauma craniano (TC) <input type="checkbox"/> Seguimento do tratamento	<input type="checkbox"/> Direito <input type="checkbox"/> Esquerdo <input type="checkbox"/> Desconhecido	<input type="checkbox"/> Menor <input type="checkbox"/> Maior	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Desconhecido	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		

* Registrar localização do sangramento

** Sangramento menor: dor fraca, inchado mínimo, mínima restrição de movimento, controle após 24 horas após o tratamento.
Sangramento maior: dor, edema, limitação de movimento, falha no controle até 24 horas após o tratamento.

Último número do dia de exposição neste formulário:

ANEXO 6

Formulário 5: Avaliação de acompanhamento

Avaliação dos fatores clínicos, imunológicos e genéticos relacionados ao desenvolvimento de inibidores em hemofilia
Estudo HEMFIL

Formulário 5
Avaliação de acompanhamento

Código do centro:

página 1 de 5

ID do paciente:

F. Eventos durante o período avaliado

1. Data da consulta:

Dia Mês Ano

Período avaliado

dias

2. Data do último formulário preenchido:

Dia Mês Ano

3. O tratamento prescrito foi realizado?

Sim (Ir para o item 4)

Não, o tratamento foi intensificado em:

Dia Mês Ano

Especificar:

Não, o tratamento foi reduzido em:

Dia Mês Ano

Especificar:

Não, o tratamento foi interrompido em:

Dia Mês Ano

Especificar:

Se o tratamento foi modificado, descreva a razão para a alteração:

- Baixa resposta
 Não cumprido pelo pai/mãe/responsável
 Não cumprido pela criança
 Problemas de punção
 Problemas no catéter
 Outro, especificar

4. Sangramentos durante o período avaliado?

- Sim, paciente tem ≤ 75 dias de exposição: anotar sangramentos e tratamentos no formulário 4: "Primeiros 75 dias de exposição".
 Sim, paciente tem mais de 75 dias exposição: anotar sangramentos na tabela do item 5.
 Não, ir para o item 6

Código do centro:

página 2 de 5

ID do paciente:

5. Número de sangramentos (se paciente com mais de 75 dias de exposição)

Localização	Sangramento Menor <i>Dor leve, inchaço mínimo, mínima restrição de movimento, melhora dentro de 24 horas após o tratamento.</i>			Sangramento Maior <i>Dor, edema, limitação de movimento, falha de resposta em 24 horas de tratamento.</i>			
	Articulação	Direito	Esquerdo	Desconhecido	Direito	Esquerdo	Desconhecido
Ombro	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Cotovelo	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Pulso	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Cintura	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Joelho	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Tornozelo	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Outro <input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Outro <input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Total de articulações	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Outros locais	Direito	Esquerdo	Desconhecido	Direito	Esquerdo	Desconhecido	
Intra-craniano	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
Muscular	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
Mucosa ou tecidos moles	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
Trauma na cabeça	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
Outro <input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
Outro <input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	

6. Uso de fatores de coagulação durante o período avaliado

- Sim, paciente com \leq 75 dias de exposição: Anotar exposições no formulário 4: "Primeiros 75 dias de exposição".
- Sim, paciente com mais de 75 dias de exposição: Anotar o uso de fator na tabela do item 7.
- Não (ir para o item 8).

7. Uso de fator de coagulação

Nome do fator de coagulação	Nº total de UI (ou mg para Novoseven) deste produto durante o período avaliado	Número total de dias de exposição a este produto durante o período avaliado
Outro <input type="text"/>	<input type="text"/> , <input type="text"/> - <input type="text"/>	<input type="text"/>
Outro <input type="text"/>	<input type="text"/> , <input type="text"/> - <input type="text"/>	<input type="text"/>
Outro <input type="text"/>	<input type="text"/> , <input type="text"/> - <input type="text"/>	<input type="text"/>
Outro <input type="text"/>	<input type="text"/> , <input type="text"/> - <input type="text"/>	<input type="text"/>
Outro <input type="text"/>	<input type="text"/> , <input type="text"/> - <input type="text"/>	<input type="text"/>
Número total de dias de exposição no período avaliado		<input type="text"/>
Número de dias para prevenção de sangramentos (profilaxia) no período avaliado		<input type="text"/>

8. Número acumulado de dias de exposição até o dia de hoje:

Número exato

ou

Número aproximado

Se o número acumulado de dias de exposição for ≤ 75 , descrever infecções, alergia, medicamentos e vacinação no formulário 3 - Dados imunológicos até o 75º dia de exposição.

9. Cirurgias ou procedimentos invasivos durante o período avaliado

Sim, preencha a tabela abaixo

Não (ir para o item 11)

Data	Tipo de cirurgia	Articulação (se aplicável)
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Nome do fator de coagulação utilizado na cirurgia	Nº total de UI (ou mg para Novoseven) deste produto durante o período da cirurgia	Número total de dias de exposição a este produto durante o período da cirurgia
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Data	Tipo de cirurgia	Articulação (se aplicável)
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Nome do fator de coagulação utilizado na cirurgia	Nº total de UI (ou mg para Novoseven) deste produto durante o período da cirurgia	Número total de dias de exposição a este produto durante o período da cirurgia
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Data	Tipo de cirurgia	Articulação (se aplicável)
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Nome do fator de coagulação utilizado na cirurgia	Nº total de UI (ou mg para Novoseven) deste produto durante o período da cirurgia	Número total de dias de exposição a este produto durante o período da cirurgia
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Código do centro:

página 4 de 5

ID do paciente:

10. Número total de dias de internação durante o período avaliado

dias ou

Não sabe / Não informa

11. Criança está estudando em:

Creche

Pré-escola

Escola normal

Escola especial

Não estuda (ir para o item 14)

12. Número total de dias fora da escola ou creche devido à hemofilia:

dias ou

Não sabe / Não informa

13. Necessita de auxílio escolar devido à hemofilia?

Sim

Não

14. Foi detectado inibidor no período descrito?

Sim

Não (ir para o item G1)

Não sabe / Não informa (ir para o item G1)

15. Inibidor positivo

UB/mL Primeira dosagem

Data

UB/mL Segunda dosagem

Data

16. Título máximo de inibidor no período avaliado:

UB/mL

Data

17. Recuperação verificada?

Sim, recuperação normal (se teste de recuperação de fator VIII \geq 66% do valor esperado)

Sim, recuperação diminuída (se teste de recuperação de fator VIII $<$ 66% do valor esperado)

Não

G. Indicação de tratamento para o próximo período

1. Indicação de tratamento será modificada comparada ao período anterior?

Sim

Não (ir para o item 3)

Código do centro:

página 5 de 5

ID do paciente:

2. Tipo de tratamento até a próxima consulta:

- Demanda
 Profilaxia
 Terapia de imunotolerância

Dose por dia

UI

Frequência por semana

vezes por semana

Ou outro (especificar)

dose inicial para sangramentos menores

UI/mg

dose inicial para sangramentos maiores

UI/mg

dose inicial para trauma grave

UI/mg

Sangramento menor: dor fraca, inchaço mínimo, mínima restrição de movimento, controle após 24 horas após o tratamento.
Sangramento maior: dor, efusão, limitação de movimento, falha no controle até 24 horas após o tratamento.

Nome do produto

Tratamento adicional

3. Dose domiciliar

- Não
 Começou na data ____ / ____ / ____
 Continua sendo aplicada pelo paciente
 Continua sendo aplicada pelos pais/responsáveis

4. Peso (Kg) no dia da consulta

Kg

5. Participante de outros estudos?

- Sim
 Não

6. Observações

ANEXO 7

Formulário 6: Final do estudo

Avaliação dos fatores clínicos, imunológicos e genéticos relacionados ao desenvolvimento de inibidores em hemofilia Estudo HEMFIL	Formulário 6 Final do estudo	Código do centro: <input type="text"/> ID do paciente: <input type="text"/>
--	--	--

página 1 de 1

1. Data do final do estudo

2. Motivo para a finalização do estudo

 Paciente / Pais / Responsáveis retiraram termo de consentimento Paciente está em tratamento em outro centro FalecimentoData:

Causa da morte

 Perda de seguimento durante o estudo Outro

3. Atingiu 100 dias de exposição sem desenvolvimento de inibidor?

 Sim Não

ANEXO 8

Formulário 7: Formulário de correção

Avaliação dos fatores clínicos,
imunológicos e genéticos
relacionados ao desenvolvimento
de inibidores em hemofilia
Estudo HEMFIL

Formulário 7
Formulário de correçãoCódigo do centro:

página 1 de 1

ID do paciente:

1. Formulário de correção de dados

- Formulário 1
 Formulário 2
 Formulário 3
 Formulário 4
 Formulário 5
 Formulário 6

2. Data da consulta ou de
preenchimento do formulário

3. Questão (Informe letra e número disponibilizado)

4. Valor incorreto submetido:

5. Valor correto a ser considerado:

6. Nome do responsável pela modificação:

7. Data

ANEXO 9

Formulário 8: Controle de coleta de material biológico

Avaliação dos fatores clínicos, imunológicos e genéticos relacionados ao desenvolvimento de inibidores em hemofilia Estudo HEMFIL	Formulário 8 Controle de coleta de material biológico	Data da visita: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	Código do centro: <input type="text"/>	página 1 de 1
		Dia Mês Ano	ID do paciente: <input type="text"/>	

Nº do tubo	Anticoagulante	Tempo do estudo ⁽¹⁾	Data ⁽²⁾			Última data de infusão de concentrado de fator de coagulação			Motivo da coleta	Material coletado		Por que a amostra não foi coletada?	Observações ⁽³⁾
			Dia	Mês	Ano	Dia	Mês	Ano		Sim	Não ⁽²⁾		
1	EDTA (5mL)		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Genotipagem (F8 ou F9),	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
2	Citrato (5mL)		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Testes sorológicos, Perfil imunológico, Hemostasia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
3	Citrato (5mL)		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Testes sorológicos, Perfil imunológico, Hemostasia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
4	Citrato (5mL)		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Testes sorológicos, Perfil imunológico, Hemostasia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
5	Citrato (5mL)		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Testes sorológicos, Perfil imunológico, Hemostasia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
6	Citrato (5mL)		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Testes sorológicos, Perfil imunológico, Hemostasia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
7	Citrato (5mL)		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Testes sorológicos, Perfil imunológico, Hemostasia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		

⁽¹⁾ Identificar o motivo de coleta da amostra de acordo com os tempos do estudo, se T0, T1 ou T2; monitoramento de Inibidores (I); acompanhamento de Imunotolerância (AIT); Final de Protocolo de Imunotolerância (FIT).

⁽²⁾ O motivo da não coleta da amostra deve ser descrito no campo "Por que a amostra não foi coletada?"

⁽³⁾ O campo de observações deve ser utilizado para descrever problemas relacionados a coleta, processamento ou armazenamento da amostra.

Os tubos nº 1 e 2 referentes aos anticoagulantes EDTA e Citrato de Sódio, respectivamente, devem ser coletados na primeira consulta após o diagnóstico (T0, vide Figura 1 do projeto) para testes imunológicos, sorológicos, inibidor, dosagem de fator e genotipagem.

- Após o diagnóstico, amostras devem ser coletadas a cada 10 dias de exposição até o 75º dia de exposição ao fator de coagulação para testes de inibidor (a partir do tubo nº 3).
- Ao 75º dia de exposição uma amostra de sangue deverá ser coletada (T1, vide Figura 1 do projeto).
- Pacientes que desenvolverem inibidor antes do 75º dia de exposição devem ter amostra coletada assim que o resultado de inibidor positivo for confirmado em segunda dosagem.
- Do 75º ao 100º dia de exposição ao fator de coagulação, as coletas devem ser realizadas a cada 3 meses.
- A partir do 100º dia de exposição, as coletas de inibidor devem ser semestrais desde que o paciente esteja em uso de concentrado de fator de coagulação.
- Caso o paciente apresente inibidor positivo confirmado sem indicação para imunotolerância, a coleta deve seguir a mesma recomendação descrita em E, isto é, deverá ser realizada a cada 3 meses.
- Pacientes que iniciaram tratamento de Imunotolerância devem manter o mesmo padrão de coletas tal como recomendado pelo Protocolo de Imunotolerância do Ministério da Saúde, isto é, a quantificação do inibidor deverá ser realizada mensalmente nos primeiros 6 meses e a seguir a cada 2 meses até atingir < 5 UB/mL, quando a quantificação deverá ser repetida mensalmente novamente. Uma amostra de sangue deverá ser coletada ao final do tratamento de imunotolerância independentemente do resultado do tratamento (T2, vide Figura 1 do projeto).

As coletas não devem ser realizadas caso o paciente apresente infecção, inflamação ou processo alérgico. Todas as amostras coletadas nos tempos determinados no projeto de pesquisa devem ser encaminhadas ao Hemocentro de Belo Horizonte.

ANEXO 10

Formulário 9: Programação para preenchimento dos formulários

Avaliação dos fatores clínicos, imunológicos e genéticos relacionados ao desenvolvimento de inibidores em hemofilia
Estudo HEMFIL

Formulário 9
Programação para
preenchimento dos formulários

página 1 de 1

Nº	Nome do formulário	1ª visita	Acompanhamento até 75 DE	Acompanhamento do 75º ao 100º DE	Obs.:
1	Avaliação Inicial	x			OB
2	Atualização de dados...		x	x	SN
3	Dados imunológicos até 75 DE....	x	x		OB
4	Primeiros 75 DE...	x	x		OPC
5	Avaliação de Acompanhamento		x	x	OB
6	Final do estudo			x	OB
7	Formulário de Correção		x	x	SN
8	Controle de coleta de material biológico				Somente pelo HBH
10	Orientações para coleta, transporte e armazenamento das amostras				N/A
11-14	TCLE	x			OB

DE: Dias de exposição

OB: Preenchimento obrigatório completo por todos os centros participantes

OPC: Preenchimento desnecessário desde que enviados dados da cartilha completos, confiáveis e verificados pelo médico responsável de cada centro no momento do retorno do paciente

SN: Preenchimento se necessário (formulários complementares ou de correção)

HBH: Preenchimento exclusivo do Hemocentro de Belo Horizonte

ANEXO 11

Formulário 11: Termo de consentimento livre e esclarecido

Avaliação dos fatores clínicos,
 imunológicos e genéticos
 relacionados ao desenvolvimento
 de inibidores em hemofilia
 Estudo HEMFIL

Formulário 11

Termo de consentimento livre e esclarecido para pesquisa científica (TCLE) – Hemofilia A

Nº Registro CEP – Hemominas:

página 1 de 2

Vimos pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido convidar você e seu filho a participarem de um projeto de pesquisa que envolve a Fundação Hemominas e a Universidade Federal de Minas Gerais. A participação neste estudo é voluntária. Você e seu filho não terão nenhum gasto com a participação no estudo. Vocês têm o direito de escolher não fazer parte ou desistir do estudo em qualquer momento, sem perda de qualquer benefício na Fundação Hemominas.

Seu filho foi diagnosticado com hemofilia A. A pessoa que tem hemofilia não produz uma proteína chamada Fator VIII (FVIII) em quantidade suficiente para fazer a coagulação do sangue. As pessoas que têm hemofilia A são normalmente tratadas com infusão intravenosa de Fator VIII (FVIII) para que possam controlar possíveis hemorragias. Após um período de tratamento alguns pacientes desenvolvem uma resposta imune contra o FVIII administrado, o que aumenta os riscos de hemorragias e falha no tratamento. Até o momento não se sabe por que somente alguns pacientes desenvolvem essa resposta imune. O objetivo deste estudo é identificar os fatores clínicos, genéticos e imunológicos relacionados ao desenvolvimento de inibidores na hemofilia.

Se vocês concordarem em participar deste estudo, seu filho será solicitado a fornecer um pouco de sangue (5mL) para exames laboratoriais. Este material será separado e estocado no Laboratório de Pesquisa no Hemocentro de Belo Horizonte e será usado apenas para os fins propostos nesta pesquisa. Seu filho será cadastrado no projeto de pesquisa para acompanhamentos periódicos e vocês poderão ser convidados a retornar à Fundação Hemominas para novas consultas com o médico, caso vocês e o médico concordem. No momento do retorno à Fundação Hemominas, poderá ser solicitada ao seu filho nova coleta de um pouco de sangue (5mL) para realização de exames de rotina e exames relacionados ao projeto de pesquisa (dosagem de FVIII, dosagem de inibidores de FVIII, dosagem de citocinas e quimiocinas do sistema imune, contagem de células do sangue, análises genéticas relacionadas à hemofilia). Os resultados dos testes realizados serão repassados a vocês pelo médico e anexados ao seu prontuário. Os riscos e desconfortos deste estudo incluem o desconforto de coletar o sangue: este inclui a dor da picada de uma agulha e uma pequena chance de cor roxa no local da punção.

Caso você autorize, o material coletado neste estudo poderá ser usado pelos mesmos pesquisadores envolvidos nesta pesquisa em futuras investigações com objetivos semelhantes: investigar marcadores genéticos, imunológicos e bioquímicos que podem ter influência nas manifestações clínicas da hemofilia. Neste caso, a amostra será conservada sem prazo para descarte (Banco de Amostras). Entretanto, o uso futuro deste material nunca será ligado a nenhum dado pessoal do participante. Você pode negar a permissão para o uso da amostra em estudos futuros e ainda assim participar deste projeto. Se você autorizar o uso futuro da amostra coletada, qualquer novo estudo utilizando esta amostra deverá ser avaliado e autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas. Se a nova pesquisa não trouxer benefícios ou riscos para o participante, você não será informado sobre seu uso.

O conhecimento que for adquirido na pesquisa poderá trazer informações e orientações futuras em relação ao desenvolvimento de inibidores de FVIII na hemofilia A. Você e seu filho não serão identificados quando o sangue coletado ou os registros médicos forem utilizados, seja para propósitos de publicação científica ou educativa. Ao assinar este consentimento informado, você autoriza a leitura e acompanhamento dos prontuários médicos de seu filho. Na divulgação dos resultados, seus nomes não serão mostrados, garantindo a vocês sigilo e privacidade.

Declaração de consentimento

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

Autorizo o armazenamento das amostras coletadas para utilização em estudos futuros.

Não autorizo o armazenamento das amostras coletadas para utilização em estudos futuros.

Identificação do participante:

Nome: _____

Nº Prontuário: _____

Assinatura do responsável

Data: ____/____/____

Daniel Gonçalves Chaves Pesquisador

Contato com o pesquisador:

(31) 3248 4587 - daniel.chaves@hemominas.mg.gov.br (Daniel G. Chaves)

(31) 3248 4587 - mapsbh@bol.com.br (Marcio Portugal)

(31) 3409 9746 - srezende@medicina.ufmg.br (Suely M. Rezende)

Contato Comitê de Ética em Pesquisa: (31) 3248 4587 - cep@hemominas.mg.gov.br

ANEXO 12

Formulário 15: Termo de assentimento

Avaliação dos fatores clínicos,
 genéticos e imunológicos
 relacionados ao desenvolvimento
 de inibidores em hemofilia.
Estudo HEMFIL

Formulário 15
Termo de assentimento – Hemofilia A
 (Menor entre 13 a 17 anos)

Nº Registro CEP – Hemominas:

página 1 de 2

Vimos pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido convidar você a participar de um projeto de pesquisa que envolve a Fundação Hemominas e a Universidade Federal de Minas Gerais. A participação neste estudo é voluntária. Você não terá nenhum gasto com a participação no estudo. Você tem o direito de escolher não fazer parte ou desistir do estudo em qualquer momento, sem perda de qualquer benefício na Fundação Hemominas.

Você foi diagnosticado com hemofilia A. A pessoa que tem hemofilia não produz uma proteína chamada Fator VIII (FVIII) em quantidade suficiente para fazer a coagulação do sangue. As pessoas que têm hemofilia B são normalmente tratadas com infusão intravenosa de Fator VIII (FVIII) para que possam controlar possíveis hemorragias. Após um período de tratamento alguns pacientes desenvolvem uma resposta imune contra o FVIII administrado, o que aumenta os riscos de hemorragias e falha no tratamento. Até o momento não se sabe por que somente alguns pacientes desenvolvem essa resposta imune. O objetivo deste estudo é Identificar os fatores clínicos, genéticos e imunológicos relacionados ao desenvolvimento de inibidores na hemofilia.

Para participar desta pesquisa, o responsável por você deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. Você será solicitado a fornecer um pouco de sangue (5mL) para exames laboratoriais. Este material será separado e estocado no Laboratório de Pesquisa no Hemocentro de Belo Horizonte e será usado apenas para os fins propostos nesta pesquisa. Você será cadastrado no projeto de pesquisa para acompanhamentos periódicos e poderá ser convidado a retornar à Fundação Hemominas para novas consultas com o médico, caso você e o médico concordem. No momento do retorno à Fundação Hemominas, poderá ser solicitada nova coleta de um pouco de sangue (5mL) para realização de exames de rotina e exames relacionados ao projeto de pesquisa (dosagem de FVIII, dosagem de inibidores de FVIII, dosagem de citocinas e quimiocinas do sistema imune, contagem de células do sangue, análises genéticas relacionadas à hemofilia). Os resultados dos testes realizados serão repassados a você e seu responsável pelo médico e anexados ao seu prontuário. Os riscos e desconfortos deste estudo incluem o desconforto de coletar o sangue: este inclui a dor da picada de uma agulha e uma pequena chance de cor roxa no local da punção.

Caso você autorize, o material coletado neste estudo poderá ser usado pelos mesmos pesquisadores envolvidos nesta pesquisa em futuras investigações com objetivos semelhantes: investigar marcadores genéticos, imunológicos e bioquímicos que podem ter influência nas manifestações clínicas da hemofilia. Neste caso, a amostra será conservada sem prazo para descarte (Banco de Amostras). Entretanto, o uso futuro deste material nunca será ligado a nenhum dado pessoal do participante. Você pode negar a permissão para o uso da amostra em estudos futuros e ainda assim participar deste projeto. Se você autorizar o uso futuro da amostra coletada, qualquer novo estudo utilizando esta amostra deverá ser avaliado e autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas. Se a nova pesquisa não trazer benefícios ou riscos para o participante, você não será informado sobre seu uso.

O conhecimento que for adquirido na pesquisa poderá trazer informações e orientações futuras em relação ao desenvolvimento de inibidores de FVIII na hemofilia A. Você não será identificado quando o sangue coletado ou os registros médicos forem utilizados, seja para propósitos de publicação científica ou educativa. Ao assinar este consentimento informado, você autoriza a leitura e acompanhamento dos seus prontuários médicos. Na divulgação dos resultados, seu nome não será mostrado, garantindo a você e ao seu responsável, sigilo e privacidade.

Avaliação dos fatores clínicos, genéticos e imunológicos relacionados ao desenvolvimento de inibidores em hemofilia.
Estudo HEMFIL

Formulário 15
Termo de assentimento – Hemofilia A
(Menor entre 13 a 17 anos)

Nº Registro CEP – Hemominas:

página 2 de 2

Declaração de consentimento

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

- Autorizo** o armazenamento das amostras coletadas para utilização em estudos futuros.
- Não autorizo** o armazenamento das amostras coletadas para utilização em estudos futuros.

Identificação do participante:

Nome: _____ Nº Prontuário: _____

Assinatura do menor

Data: ____/____/____

Daniel Gonçalves Chaves Pesquisador

Contato com o pesquisador:

(31) 3248 4587 - daniel.chaves@hemominas.mg.gov.br (Daniel G. Chaves)
(31) 3248 4587 – mapsbh@bol.com.br (Marcio Portugal)
(31) 3409 9746 - srezen@medicina.ufmg.br (Suely M. Rezende)

Contato Comitê de Ética em Pesquisa:

(31) 3248 4587 cep@hemominas.mg.gov.br

ANEXO 13

Cartilha de acompanhamento dos pacientes

Projeto Hemfil

Introdução

Esta caderneta está organizada de forma que você possa facilmente tomar nota dos primeiros 75 dias em que seu filho receberá o concentrado de fator de coagulação. Pedimos também que sejam incluídos nesta caderneta outros medicamentos e vacinas que ele tenha tomado. Estes dados serão utilizados pelo estudo "Avaliação dos fatores clínicos, genéticos e imunológicos relacionados ao desenvolvimento de inibidores em hemofilia", no qual seu filho está participando.

É importante que sejam anotadas não só as infusões que são realizadas em casa, mas também todas as infusões que são realizadas nas visitas de seu filho ao centro de hemofilia ou durante as internações ou visita a pronto-socorro, etc. Enfim, todas as infusões devem ser anotadas. Por esse motivo, pedimos que leve sempre com você esta caderneta de maneira que se possa prontamente registrar todos os dados.

O uso da caderneta é necessário para se obter um bom acompanhamento sobre:

- ▶ Motivo do tratamento
- ▶ Tipo de sangramento, localização e gravidade
- ▶ Uso do concentrado
- ▶ Possíveis efeitos colaterais
- ▶ Uso de outros medicamentos
- ▶ Uso de vacinas

2

Projeto Hemfil

Tenha em mente que, para que se evite a perda de informações importantes, é bom que todos os dados sejam imediatamente anotados na caderneta cada vez que seu filho receba uma infusão.

Certifique-se de que está levando a caderneta cada vez que for ao centro de hemofilia, independentemente do motivo de sua ida: consulta de rotina, visita de urgência em caso de sangramento, hospitalização ou para receber fator de coagulação.

Paciente

Nome completo: _____

Data de nascimento: _____

Endereço completo: _____

Telefone fixo: _____

Celular: _____

E-mail: _____

Centro de Hemofilia

Nome: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

3

Médico responsável pelo atendimento do projeto de pesquisa

Nome: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Histórico clínico:

Tipo de hemofilia: () A () B

Atividade residual do fator: _____% () fator VIII () fator IX

Tem Inibidor?: () Sim () Não

Se sim, título: _____ UB/mL. Data: ____/____/____

Plano de tratamento no centro de hemofilia

Data: _____ Peso (Kg): _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Nome do médico: _____

Tratamento: () demanda () profilaxia () combinado

Profilaxia: _____

Dose em sangramento menor: _____

_____ Dose em sangramento maior:

_____ Dose em traumatismo:

Se você tiver alguma dúvida, entre em contato com seu médico do centro de hemofilia

Outras recomendações / pontos importantes

Concentrado de Fator de Coagulação

Depois de qualquer infusão, você deverá preencher na caderneta:

Data da infusão

Motivo da infusão

(P) devido à profilaxia, quando realizado sob prescrição médica ou quando realizado como infusão adicional como precaução caso se preveja um forte esforço físico;

(SA) devido a um sangramento, assim como depois de um traumatismo leve para evitar progressão para um sangramento maior;

(SE) devido ao seguimento do tratamento, quando se necessita mais de uma infusão após um sangramento;

(C) devido a uma cirurgia, intervenção cirúrgica ou extração dentária.

Informações sobre o sangramento

- ▶ Localização: no caso de sangramento em articulações (juntas), informe o nome da articulação afetada, por exemplo, ombro, cotovelo, punho, cintura, joelho ou tornozelo.

- ▶ Em outros tipos de sangramento (muscular, mucosa ou outros tecidos), escreva a localização e o tipo de sangramento.
- ▶ Se você não está certo do tipo de sangramento, faça uma descrição, por exemplo, pancada na cabeça, mordida no lábio, hematoma no antebraço, etc
- ▶ Lado do sangramento: se esquerdo (E) ou direito (D)
- ▶ Gravidade do sangramento: anote se trata-se de um sangramento de importância "menor" ou "maior"
- ▶ Importância menor: dor leve, inchaço pouco acentuado, restrição mínima de movimento, resolvido com 24 horas de tratamento.
- ▶ Importância maior: dor ou inchaço grande, impedimento de movimento, sem resposta após 24 horas de tratamento.

Dados sobre o concentrado de fator infundido

- ▶ Nome do produto
- ▶ Número total de unidades infundido
- ▶ Número do lote dos frascos
- ▶ Possibilidade de ter infundido sob a pele ou no músculo: marque "não" se a infusão tiver sido realizada adequadamente e "sim" se foi sob a pele ou no músculo
- ▶ Outras informações: reações alérgicas ou outros efeitos adversos, assim como informações sobre coisas que não são comuns ao tratamento habitual.

Projeto Hemfil

Nome do medicamento	Motivo do uso	Começo do uso (dia, mês e ano)	Término do uso (dia, mês e ano)

19

Projeto Hemfil

Vacinas

Anote na tabela as seguintes informações:

- ▶ Tipo de vacina (DPT, hepatite B, etc)
- ▶ Modo de vacinação: subcutâneo (sob a pele) ou intramuscular (no músculo)
- ▶ Data da vacinação
- ▶ Reações adversas à vacina, caso tenham ocorrido

21

Projeto Hemfil

Tipo de vacina	Modo de vacinação	Data da vacinação (dia, mês e ano)	Reações, caso tenha ocorrido
	<input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Muscular		
	<input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Muscular		
	<input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Muscular		
	<input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Muscular		
	<input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Muscular		
	<input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Muscular		
	<input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Muscular		
	<input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Muscular		
	<input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Muscular		
	<input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Muscular		
	<input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Muscular		
	<input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Muscular		
	<input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Muscular		
	<input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Muscular		
	<input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Muscular		
	<input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Muscular		
	<input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Muscular		
	<input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Muscular		
	<input type="checkbox"/> Subcutâneo <input type="checkbox"/> Muscular		

22

Projeto Hemfil

Elaboração:
Colaboradores do RODIN Study e PedNet Hemophilia Registry

Tradução:
Daniel Chaves

Revisão:
Suely Meireles Rezende
Marcio Portugal

Capa, projeto gráfico e diagramação:
Fabiano Bastos

Instituições executoras
Universidade Federal de Minas Gerais
Fundação HEMOMINAS

Instituições financiadoras
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
Fundo Nacional de Saúde

24