

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

**EDUARDA BOLINA SANTOS**

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO PELO HCV NA OCORRÊNCIA DE  
INIBIDORES EM PACIENTES COM HEMOFILIA A: AVALIAÇÃO DE  
BIOMARCADORES DA RESPOSTA IMUNE**

**BELO HORIZONTE**

**2020**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

**EDUARDA BOLINA SANTOS**

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO PELO HCV NA OCORRÊNCIA DE INIBIDORES EM  
PACIENTES COM HEMOFILIA A: AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DA RESPOSTA IMUNE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Microbiologia da Universidade  
Federal de Minas Gerais como requisito do  
Mestrado Acadêmico

Orientadora: Dra. Marina Lobato Martins

Coorientadora: Profa. Dra. Edel Figueiredo  
Barbosa Stancioli

**BELO HORIZONTE**

**2020**

043 Santos, Eduarda Bolina.

Estudo da influência da infecção pelo HCV na formação de inibidores em pacientes com hemofilia A: avaliação de biomarcadores da resposta imune [manuscrito] / Eduarda Bolina Santos. – 2020.

107 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Marina Lobato Martins. Coorientadora: Profa. Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pósgraduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Hepacivirus. 3. Hemofilia A. 4. Inibidores dos Fatores de Coagulação Sanguínea. 5. Citocinas. 6. Quimiocinas. 7. Hepatite C. I. Martins, Marina Lobato. II. Stancioli, Edel Figueiredo Barbosa. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579

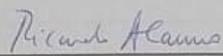


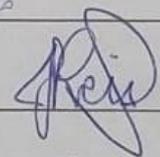
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

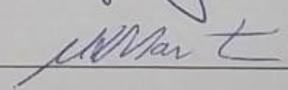
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Eduarda Bolina Santos  
Nº REGISTRO: 2018684765

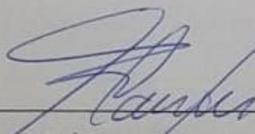
Às 09 horas do dia 28 de fevereiro de 2020, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Ricardo Andrade Carmo, Prof. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis e a Dra. Marina Lobato Martins, orientadora, para julgar o trabalho final "Estudo Da Influência Da Infecção Pelo HCV Na Formação De Inibidores Em Pacientes Com Hemofilia A: Avaliação De Biomarcadores Da Resposta Imune", da aluna **Eduarda Bolina Santos**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Dr(a). Ricardo Andrade Carmo 

Dr(a). Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis 

Dr(a). Marina Lobato Martins [orientadora] 

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca  
Coordenador do Curso de  
Pós-Graduação em Microbiologia/ICB/UFMG

  
Prof. Flávio Guimarães da Fonseca  
Coordenador do PPGM/UFMG

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço a Deus por ter me dado saúde e disposição para superar as dificuldades.

Aos meus pais pelo incentivo e amor. Agradeço todo o apoio para que eu desenvolvesse esse trabalho e que entenderam a minha ausência em determinadas situações durante a execução deste. À minha irmã pelo companheirismo e carinho de sempre.

Ao Dener pelo amor e incentivo no processo de construção desta dissertação, entendendo os momentos de ausência e nervosismo principalmente na reta final da confecção deste.

A UFMG e ao departamento de Pós-graduação em Microbiologia pela oportunidade de desenvolver o mestrado, deixando este de ser um sonho e se tornando realidade. O meu obrigada ao corpo docente, à direção e à administração por realizarem seu trabalho com dedicação, para garantir o ensino de qualidade.

À Fundação Hemominas (FH) pela oportunidade de realizar esse trabalho na instituição. Aos pacientes que aceitaram participar do estudo, muito obrigada!

À minha orientadora Dra. Marina Lobato Martins agradeço pelos inúmeros aprendizados. Agradeço a sua disponibilidade, generosidade e conhecimento, pois foram fundamentais para a minha construção acadêmica. Muito obrigada por todo apoio durante esse período, por todas as discussões, por todas as versões corrigidas, pelas idas a bancada, por me orientar na construção deste trabalho.

À minha coorientadora Prof. Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli agradeço por ter me recebido de braços abertos, por toda atenção e dedicação, para que eu pudesse realizar esse trabalho.

Ao Dr. Daniel Chaves e à Dra. Maria Clara Malta agradeço por todo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas e amigos que tenho na FH e no LVBA agradeço pela parceria, colaboração e pelo companheirismo de sempre. Vocês são parte deste trabalho e sem vocês esse percurso teria sido mais difícil, em especial, a Gaby.

Agradeço as agências de fomento pelo recurso investido.

## RESUMO

Pacientes com hemofilia A apresentavam até meados da década de 90, devido à ausência de testes na doação de sangue ou de inativação viral em hemoderivados, alto risco de adquirir doenças infecciosas transmissíveis pelo sangue, como o HCV. Superado este problema, o desenvolvimento de anticorpos inibidores do FVIII (anti-FVIII) configura atualmente o principal problema no manejo da hemofilia A. Este estudo teve como objetivo investigar a influência da infecção pelo HCV na ocorrência de inibidores em pacientes com hemofilia A pela análise de biomarcadores da resposta imune (citocinas e quimiocinas plasmáticas). Foram selecionados 197 pacientes acompanhados na Hemocentro de Belo Horizonte, Fundação Hemominas entre os anos de 1985 a 2018, sendo classificados em diferentes grupos: soronegativos (para HCV, HBV, HIV, HTLV, Sífilis e Doença de Chagas) e sem histórico de desenvolvimento de inibidor ( $SN^{INB^-}$ , n=62); soronegativo e com histórico de desenvolvimento de inibidor ( $SN^{INB^+}$ , n=34); exposto ao HCV (anti-HCV reativo) e sem histórico de desenvolvimento de inibidor ( $HCV^{INB^-}$ , n=50); exposto ao HCV e com histórico de desenvolvimento de inibidor ( $HCV^{INB^+}$ , n=51). A quantificação das citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-17A) e quimiocinas (CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1 e CXCL10/IP-10) foi feita em amostras de plasma por citometria de fluxo. Dados retrospectivos dos pacientes foram obtidos dos prontuários médicos e comparados entre os grupos soronegativos e expostos ao HCV. Idade avançada, maior frequência de uso de crioprecipitado e plasma fresco congelado, de hemofilia grave, de história de desenvolvimento de inibidor, de níveis mais baixos de inibidor e de comorbidades foram significativamente associados à exposição ao HCV. Entre os pacientes expostos ao HCV, 30% alcançou *clearance* viral e 60,6% daqueles com infecção crônica não apresentavam alteração hepática. A análise dos biomarcadores mostrou maiores concentrações plasmáticas para a maioria das citocinas dosadas nos indivíduos  $INB^+$  em comparação com os  $INB^-$ . No grupo  $SN^{INB^-}$  observou-se altas concentrações de IL-4; no grupo  $SN^{INB^+}$  observou-se altas concentrações de IFN- $\gamma$ , TNF, IL-4 e IL-10; no grupo  $HCV^{INB^-}$  observou-se baixas concentrações de todas as citocinas, mas altas concentrações das quimiocinas CXCL8 e CCL2, e o grupo  $HCV^{INB^+}$  apresentou níveis reduzidos de IFN- $\gamma$  e TNF, mas altas concentrações de IL-2, IL-6, IL-17 e IL-10, além de elevada concentração das quimiocinas CXCL9 e CXCL10. A análise multivariada das concentrações plasmáticas dos biomarcadores mostrou agrupamentos diferenciados dos pacientes de acordo com o *status* de infecção pelo HCV e de formação de inibidor. A matriz de *Heatmap* evidenciou o agrupamento dos pacientes em três principais perfis:  $HCV^{INB^+}$ : maiores concentrações de CXCL9 e CXCL10, níveis médios a baixos de IL-4 e de IFN- $\gamma$ ;  $HCV^{INB^-}$ : baixas concentrações de CXCL9 e IFN- $\gamma$ , sendo o grupo com os menores níveis de IL-4; soronegativos sem ou com INB ( $SN^{INB^-/INB^+}$ ): concentrações baixas de CXCL9 e CXCL10, e níveis mais altos de IL-4, TNF e IFN- $\gamma$ . Assim, IL-4 e IFN- $\gamma$  parecem ser os principais indicadores de ocorrência de inibidor, enquanto que CXCL9 e CXCL10 de resposta ao HCV. Nós propomos que o HCV pode ser um fator que potencializa o início da resposta de formação de anticorpos anti-FVIII por induzir uma resposta Th1, mas ao mesmo tempo, pode ser um imunomodulador dessa resposta humoral, provavelmente ao diminuir a resposta Th2 que é importante na manutenção de altos níveis de inibidor. Esses achados sugerem novas perspectivas para futuros estudos com pacientes com hemofilia em busca de estabelecer um modelo para explicar a imunomodulação entre a infecção pelo HCV e a formação de inibidores.

Palavras chave: HCV, hemofilia A, inibidores do FVIII, citocinas, quimiocinas, hepatite C

## ABSTRACT

Patients with hemophilia A were at high risk of acquiring blood-borne infectious diseases, such as HCV, until the mid-1990s. This problem has been overcome and currently the development of FVIII inhibitors (anti-FVIII) represents a major problem in the management of hemophilia A. This study aimed to investigate the influence of HCV infection on the occurrence of inhibitors in patients to analyze biomarkers of the immune response (plasma cytokines and chemokines). Patients (n=197) who were followed up at Hemocentro de Belo Horizonte, Fundação Hemominas between 1985 and 2018, were classified in different groups: seronegative (negative for HCV, HBV, HIV, HTLV, Syphilis and Chagas Disease) and without history of inhibitor development ( $SN^{INB^-}$ , n=62); seronegative and with history of inhibitor development ( $SN^{INB^+}$ , n=34); exposed to HCV (anti-HCV reactive) and without history of inhibitor development ( $HCV^{INB^-}$ , n=50); exposed to HCV and with history of inhibitor development ( $HCV^{INB^+}$ , n=51). Quantification of cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$  and IL-17A) and chemokines (CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1 and CXCL10/IP-10) was performed on plasma samples by flow cytometry. Retrospective patients' data were obtained from medical records and compared between seronegative and exposed to HCV groups. Older age, more frequent use of cryoprecipitate and fresh frozen plasma, severe hemophilia, history of inhibitor development, lower levels of inhibitor and comorbidities were significantly associated with exposure to HCV. Among patients exposed to HCV, 30% achieved viral clearance and 60.6% of those with chronic infection did not have liver disorders. The analysis of biomarkers showed higher plasma concentrations for most of the cytokines measured in the  $INB^+$  individuals compared to the  $INB^-$ . The  $SN^{INB^-}$  group showed high concentrations of IL-4; the  $SN^{INB^+}$  group, high concentrations of IFN- $\gamma$ , TNF, IL-4 and IL-10; the  $HCV^{INB^-}$  group, low concentrations of all cytokines, but high concentrations of the chemokines CXCL8 and CCL2; and the  $HCV^{INB^+}$  group, reduced levels of IFN- $\gamma$  and TNF, but high concentrations of IL-2, IL-6, IL-17A and IL-10, in addition to high concentration of CXCL9 and CXCL10 chemokines. Multivariate analysis of plasma concentrations of biomarkers showed differentiated clusters of patients according to status of HCV infection and inhibitor occurrence. The Heatmap matrix showed clustering of patients into three main profiles:  $HCV^{INB^+}$ : with higher concentrations of CXCL9 and CXCL10, medium to low levels of IL-4 and IFN- $\gamma$ ;  $HCV^{INB^-}$ : with low concentrations of CXCL9 and IFN- $\gamma$  and the lowest levels of IL-4; seronegative patients with or without inhibitor ( $SN^{INB^-/INB^+}$ ): with low concentrations of CXCL9 and CXCL10, and higher levels of IL-4, TNF and IFN- $\gamma$ . Thus, IL-4 and IFN- $\gamma$  appear to be the main indicators of inhibitor occurrence, while CXCL9 and CXCL10 of response to HCV. We propose that HCV may be a factor that potentiates the initiation of the anti-FVIII antibody formation response by inducing a Th1 response, but at the same time, it can be an immunomodulator of this humoral response, probably by decreasing the Th2 response, which is important in maintaining high levels of inhibitor. These findings suggest new perspectives for future studies with patients with hemophilia to establish a model to explain the immunomodulation between HCV infection and the formation of inhibitors.

Keywords: HCV, hemophilia A, FVIII inhibitors, cytokines, chemokines, hepatitis C

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Hereditariedade da hemofilia .....	15
Figura 2: Níveis de inibidor em pacientes com Hemofilia.....	17
Figura 3: Respostas imunes primária e secundária que levam ao desenvolvimento de inibidores em pacientes com hemofilia A. ....	19
Figura 4: Fluxograma para o tratamento de pacientes com hemofilia A e inibidores.....	22
Figura 5: Mortalidade global de hepatites virais, HIV, tuberculose e malária entre 2000-2015 .....	26
Figura 6: Causas de óbitos por hepatites virais. ....	26
Figura 7: Distribuição dos óbitos associados às hepatites virais no Brasil, entre 2000-2015.....	27
Figura 8: Distribuição global dos genótipos do HCV.....	28
Figura 9: Estrutura da partícula do HCV e função das suas proteínas .....	29
Figura 10: Ciclo de multiplicação do HCV .....	31
Figura 11: Progressão da infecção pelo HCV .....	35
Figura 12: História natural da infecção pelo HCV.....	36
Figura 13: Infecção pelo HCV e principais respostas imunes inatas e adaptativas.....	41
Figura 14: As citocinas e suas funções na diferenciação das respostas Th.....	43
Figura 15: População de pacientes com hemofilia A incluída no estudo de biomarcadores de resposta imunológica.....	49
Figura 16: Pacientes selecionados para a quantificação de biomarcadores imunológicos.....	53
Figura 17: Concentrações de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$ e IL-17A no plasma de pacientes com hemofilia A sem histórico de infecção pelo HCV ou com infecção passada ( <i>clearance</i> ) ou presente (crônica) de HCV e sem (símbolos brancos) ou com (símbolos pretos) história de desenvolvimento de inibidor.....	64
Figura 18: Concentrações de CXCL8, CCL2, CCL5, CXCL9 e CXCL10 no plasma de pacientes com hemofilia A sem histórico de infecção pelo HCV ou com infecção passada ( <i>clearance</i> ) ou presente (crônica) de HCV e sem (símbolos brancos) ou com (símbolos pretos) história de desenvolvimento de inibidor. ....	65
Figura 19: Frequência de altos produtores de citocinas e quimiocinas plasmáticas em pacientes com hemofilia A classificados em diferentes grupos.....	71
Figura 20: Matriz de correlação de Spearman entre as concentrações das citocinas e quimiocinas em amostras de plasma de pacientes com hemofilia A soronegativos ou com exposição ao HCV (Grupo HCV, infecção passada ou presente) .....	74

Figura 21: Rede de interação entre citocinas e quimiocinas em grupos de pacientes com hemofilia A.....	76
Figura 22: Análise de componentes principais para a concentração plasmática de citocinas e quimiocinas em pacientes com hemofilia A com ou sem exposição ao HCV (HCV e SN, respectivamente) apresentando ou não histórico de desenvolvimento de inibidor (INB+ e INB-, respectivamente).....	78
Figura 23: Análise de Componentes Principais para a concentração plasmática de citocinas e quimiocinas em pacientes com hemofilia A com ou sem histórico de desenvolvimento de inibidor (INB- e INB+, respectivamente) .....	79
Figura 24: <i>Heatmap</i> das concentrações plasmáticas de citocinas e quimiocinas em pacientes com hemofilia A .....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Definições das modalidades de tratamento de reposição de FVIII .....	21
Tabela 2: Descrição das principais funções das citocinas e quimiocinas.....	44
Tabela 3: Características clínicas e de tratamento de pacientes portadores de hemofilia A segundo exposição ao HCV, Belo Horizonte, MG, 1985-2018. ....	55
Tabela 4: Característica da infecção pelo HCV nos pacientes com hemofilia A da FH, Belo Horizonte, MG, entre os anos 1985-2018.....	59
Tabela 5: Concentrações de citocinas e quimiocinas plasmáticas em pacientes com hemofilia A, da FH, Belo Horizonte, MG, entre os anos 1985-2018, com ou sem exposição ao HCV e comparação entre aqueles com ou sem registro de desenvolvimento de inibidor do FVIII pertencentes ao mesmo grupo (intragrupo) .....	62
Tabela 6: Comparações das concentrações de citocinas e quimiocinas plasmáticas entre grupos de pacientes com hemofilia A, da FH, Belo Horizonte, MG, entre os anos 1985-2018, com diferentes status de infecção pelo HCV e sem história de desenvolvimento de inibidor do FVIII .....	66
Tabela 7: Comparações das concentrações de citocinas e quimiocinas plasmáticas entre grupos de pacientes com hemofilia A, da FH, Belo Horizonte, MG, entre os anos 1985-2018, com diferentes status de infecção pelo HCV e com história de desenvolvimento de inibidor do FVIII .....	66
Tabela 8: Concentrações de citocinas e quimiocinas plasmáticas em pacientes com hemofilia A, da FH, Belo Horizonte, MG, entre os anos 1985-2018, com exposição ao HCV e com ou sem registro de desenvolvimento de inibidor do FVIII.....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ALT: alanina aminotransferase
- Anti-FVIII: anticorpos contra o fator VIII da coagulação
- APC: Célula apresentadora de antígeno
- CCL2/MCP-1: quimiocina ligante 2 de CC/proteína quimiotática de monócitos 1
- CCL5/RANTES: quimiocina ligante 5 de CXC quimiocinas/ regulada sob ativação expressa e secretada por células T normais
- CXCL10/IP-10: quimiocina ligante 10 de CXC/proteína induzida por IFN- $\gamma$
- CXCL8/IL-8: quimiocina ligante 8 de CXC/ Interleucina-8
- CXCL9/MIG: quimiocina ligante 9 de CXC/monócina induzido por IFN- $\gamma$
- DAAs: Antivirais de ação direta, do inglês *direct-acting antiviral*
- DC: Células dendríticas
- FH: Fundação Hemominas
- FVIII: Fator VIII da coagulação
- HBV: Vírus da Hepatite B, do inglês *hepatitis B virus*
- HBH: Hemocentro de Belo Horizonte
- HCC: Hepatocarcinoma celular
- HCV: Vírus da Hepatite C, do inglês *hepatitis C virus*
- HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana
- HLA: Antígeno leucocitário humano
- ICTV: Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, do inglês *International Committee on Taxonomy of Viruses*
- IFN- $\alpha$ : Interferon-*alfa*
- IFN- $\gamma$ : Interferon-*gamma*
- IgE: Imunoglobulina E
- IgG: Imunoglobulina G
- IgG1: Imunoglobulina G de subclasse 1
- IgG2: Imunoglobulina G de subclasse 2
- IgG4: Imunoglobulina G de subclasse 4
- IL-10: Interleucina 10
- IL-17A: Interleucina 17A
- IL-2: Interleucina 2
- IL-4: Interleucina 4

IL-6: Interleucina 6

IRF3/IRF7: Fator regulador de interferon 3/ Fator regulador de interferon 7

ISGs: Genes estimulados de IFN do inglês *interferon-stimulated gene*

ISTH: Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia, do inglês *International Standard of Thromboses and Haemostasis*

ITI: Indução de tolerância imunológica

JAK/STAT: do inglês *Janus kinase/signal transducers and activators of Transcription*

MAVS: do inglês *Mitochondrial antiviral-signaling protein*

MDA5: Tipo de RIG-1 do inglês *melanoma differentiation-associated protein 5*

NAT: Teste de Ácido Nucleico, do inglês *nucleic acid test*

NF-κB: Fator nuclear kappa B do inglês

NK: Células *Natural Killer*

NKT: Células T *Natural Killer*

NTR: Região Não Traduzida, do inglês *non translated region*

OMS: Organização Mundial de Saúde

PCA: Análise de componente principal, do inglês *principal component analysis*

PCR: Reação em cadeia da polimerase, do inglês *polymerase chain reaction*

PegIFN-α: Interferon-α peguilhado

PHA: Portadores de Hemofilia A

PRRs: Receptores de Reconhecimento Padrão, do inglês *pattern recognition receptors*

RIG-1: Tipo de PRRs do inglês *retinoic acid-inducible gene-1*

RNA: Ácido Ribonucleico

mRNAs: Ácido Ribonucleico mensageiro

RVS: Resposta Viroológica Sustentada

STAT1: do inglês *Signal transducer and activator of transcription 1*

STAT2: do inglês *Signal Transducer And Activator of Transcription 2*

SUS: Sistema Único de Saúde

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCR: Receptor de Células T

TGF-β: Fator de crescimento transformador-β

T *helper*/ Th: Célula T auxiliar, do inglês *T helper*

TLR: receptor TLR, do inglês *Toll-like receptor*

TNF: Fator de necrose tumoral

Tregs: Células T reguladoras

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Características gerais da hemofilia A .....	15
1.2 Manifestações clínicas em pacientes com Hemofilia A .....	16
1.3 Mecanismos moleculares na geração de anticorpos anti-FVIII.....	18
1.4 Tratamento de pacientes com hemofilia A .....	20
1.5 Complicações clínicas em pacientes com hemofilia A .....	23
1.5.1 Infecção pelo HCV em pacientes com hemofilia .....	24
1.6 Epidemiologia da infecção pelo HCV .....	24
1.7 Distribuição geográfica dos genótipos do HCV .....	27
1.8 Estrutura viral e organização genômica do HCV .....	29
1.9 Ciclo de multiplicação do HCV.....	30
1.10 Transmissão, diagnóstico e tratamento do HCV .....	32
1.11 História natural da infecção pelo HCV.....	35
1.12 Resposta imune desencadeada pelo HCV .....	38
1.12.1 Resposta imune inata frente ao HCV .....	38
1.12.2 Resposta imune adaptativa frente ao HCV.....	39
1.13 Citocinas e quimiocinas como biomarcadores da resposta imune .....	42
2 JUSTIFICATIVA .....	46
3 OBJETIVOS.....	46
3.1 Objetivo Geral .....	47
3.2 Objetivos Específicos .....	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
4.1 População de estudo .....	48
4.2 Variáveis analisadas .....	50
4.3 Quantificação de citocinas e quimiocinas no plasma de pacientes com hemofilia A usando citometria de fluxo.....	52
4.4 Análises Estatísticas .....	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
5.1 História clínica e de tratamento da hemofilia A .....	55
5.2 Características relacionadas a infecção pelo HCV nos pacientes com hemofilia A .....	58

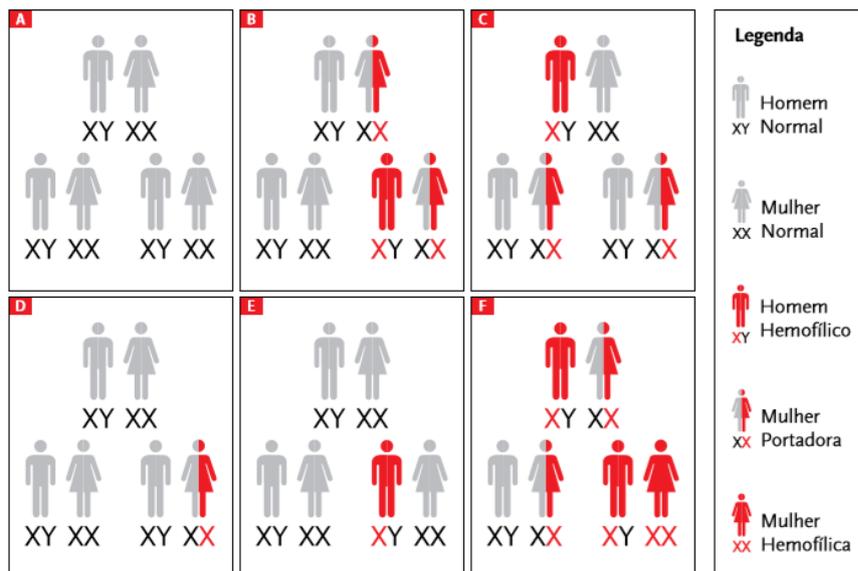
5.3 Análise dos biomarcadores de resposta imunológica nos pacientes com hemofilia A soronegativos e com história de exposição ao HCV e sem ou com história de desenvolvimento de inibidor .....	61
5.4 Análise da frequência de altos produtores de citocinas e quimiocinas plasmáticas nos grupos de pacientes com hemofilia A.....	70
5.5 Análise da correlação entre as citocinas e quimiocinas nos pacientes com hemofilia A classificados de acordo com a exposição ao HCV e de desenvolvimento de inibidor.....	74
5.6 Análise de componente principal (PCA) e de Heatmap nos pacientes com hemofilia A classificados de acordo com a exposição ao HCV e de desenvolvimento de inibidor.....	77
6 CONCLUSÃO.....	83
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	84
8 ANEXOS.....	96
ANEXO 1 .....	96
ANEXO 2 .....	100
ANEXO 3 .....	102

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Características gerais da hemofilia A

A hemofilia A é uma doença hemorrágica, hereditária, ligada ao cromossomo X, que é determinada pela deficiência ou anormalidade da atividade coagulante do fator VIII (FVIII) apresentando como característica o prolongamento do tempo da coagulação sanguínea. A prevalência geral da hemofilia A é estimada entre 1:5.000 e 1:10.000 nascimentos do sexo masculino, não sendo observadas variações significativas entre os grupos étnicos (RIZZA; SPOONER, 1983; SOUCIE *et al.*, 1998; HEDNER *et al.*, 2000). A hemofilia A representa aproximadamente 80% dos casos de hemofilia, sendo a mais prevalente (BRASIL, 2015).

As hemofilias são transmitidas quase que exclusivamente para indivíduos do sexo masculino, pois estes possuem apenas um alelo X e 70% são transmitidas por mães portadoras da mutação no gene *F8*. As mulheres possuem dois alelos do gene *F8*, e se a mulher for portadora, possui 50% de probabilidade de transmitir o alelo para sua prole (Figura 1B). Para que uma mulher tenha hemofilia é necessário que o pai tenha a doença e que a mãe seja portadora da mutação (Figura 1F). Em mulheres portadoras, a atividade plasmática do FVIII é reduzida, mas suficiente para manutenção da hemostasia. Entretanto, em 30% dos casos ocorre uma mutação “*de novo*” ou esporádica, que pode ocorrer tanto na mãe como no feto, levando a um caso isolado da doença sem presença nas gerações anteriores (Figura 1E) (BRASIL, 2015).



**Figura 1: Hereditariedade da hemofilia.** Prováveis cruzamentos genéticos para a transmissão da hemofilia. Fonte: BRASIL, 2015

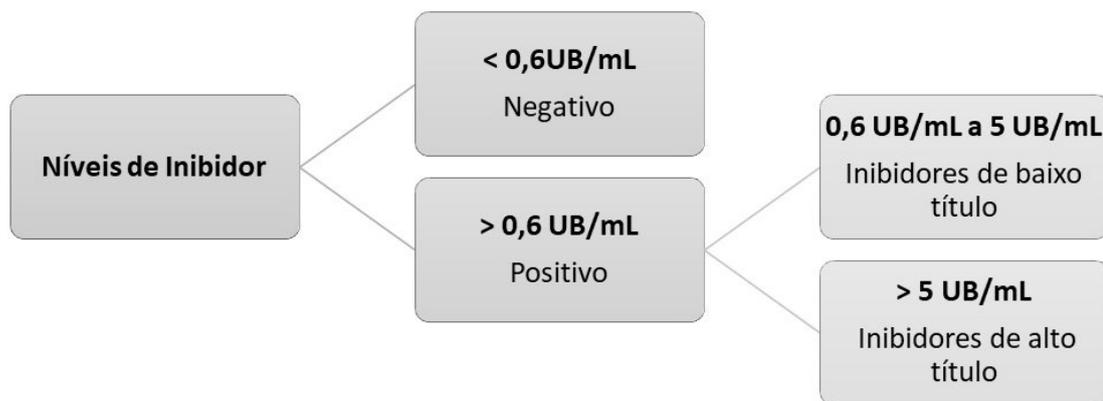
## 1.2 Manifestações clínicas em pacientes com Hemofilia A

O quadro clínico da hemofilia A é caracterizado por hemorragias recorrentes nas articulações, conhecidas por hemartroses que acomete frequentemente joelho, tornozelo, cotovelo, ombro e região coxofemoral; os hematomas acontecem nos músculos, e em casos mais extremos podem ocorrer hemorragias nos órgãos internos. A gravidade dos sangramentos na hemofilia é associada diretamente ao nível de atividade residual do FVIII no plasma, sendo classificada em grave, moderada ou leve. Por volta de 50% dos pacientes são classificados como grave e possuem atividade do FVIII inferior a 1% do normal ( $<0,01$  UI/mL), apresentando frequentes hemartroses, hematomas e hemorragias nos órgãos internos sem causa aparente (espontâneos). A forma moderada representa 10% a 20% dos pacientes que possuem atividade do fator entre 1-5% (0,01-0,05 UI/mL) e manifestam episódios hemorrágicos após pequenos traumas ou procedimentos. Aproximadamente 30% a 40% dos casos leves apresentam atividade do FVIII superior a 5% e inferior a 40% do normal (0,05-0,40 UI/mL) e os sangramentos são associados a traumas maiores ou procedimentos cirúrgicos (ANTONARAKIS *et al.*, 1995; BLANCHETTE *et al.*, 2014).

Os pacientes com hemofilia A podem desenvolver anticorpos inibidores contra o FVIII. Esses inibidores neutralizam os efeitos protetores e coagulantes da terapia de reposição do fator, que é o principal tratamento para esses pacientes. Desta forma, os pacientes com inibidores do FVIII podem apresentar hemorragias prolongadas que são de difícil tratamento, levando a um aumento da morbidade e redução da qualidade de vida (PRESCOTT *et al.*, 1997; LOLLAR, 2004; LEISSINGER *et al.*, 2011; WALSH *et al.*, 2015). A prevalência de inibidores entre pacientes com hemofilia A leve/moderada está por volta de 9%. Entretanto, em pacientes com hemofilia grave, a frequência de inibidores está entre 10% a 30% dos casos (GRINGERI *et al.*, 2003; DEKOVEN *et al.*, 2012; THORAT *et al.*, 2018). Para investigar o desenvolvimento de inibidores neutralizantes da função coagulante do fator VIII (FVIII:C) realiza-se primeiramente um teste qualitativo. Em seguida, é realizada a quantificação do inibidor pelo método de Bethesda ou Nijmegen (Bethesda modificado) (BRASIL, 2012).

Por definição, uma unidade de Bethesda (UB) inibe 50% da atividade do FVIII. Pacientes com títulos menores que 0,6 UB/mL são considerados negativos; pacientes com títulos acima de 0,6 UB/mL são considerados inibidores positivo: inibidores entre 0,6 UB/mL e 5 UB/mL são classificados como pacientes com inibidores de baixo título e títulos maiores ou iguais a 5 UB/mL são classificados como pacientes com inibidores de alto título (VERBRUGGEN *et*

*al.*,1995; 2002). Além disso, os inibidores podem ser classificados em alta e baixa resposta. Por exemplo, pacientes com títulos que apresentam níveis persistentes de inibidores inferiores a 5 UB/mL, mesmo com constante exposição ao FVIII, podem ser considerados pacientes com inibidores de baixa resposta. Em contrapartida, aqueles com títulos superiores ou iguais a 5 UB/mL são inibidores de alta resposta quando se mantém por vários meses, mesmo que o paciente interrompa a exposição ao FVIII (KASPER *et al.*,1975; LAVIGNE-LISSALDE *et al.*,2005) (Figura 2).



**Figura 2: Níveis de inibidor em pacientes com Hemofilia.** Pacientes com níveis menores que <0,6 UB/mL são considerados sem desenvolvimento de inibidor, enquanto que aqueles com >0,6 UB/mL apresentam desenvolvimento de inibidor. Os níveis de inibidores entre 0,6 UB/mL a 5 UB/mL são de baixo título e >5 UB/mL podem ser de alto título. Fonte: Adaptado de VERBRUGGEN *et al.*,1995

Entre semanas ou meses, os títulos dos inibidores podem sofrer alterações e até mesmo desaparecer por completo espontaneamente (DIMICHELE, 2000; CARAM *et al.*,2011).

Os fatores de risco associados ao desenvolvimento de inibidores são considerados multifatoriais: fatores genéticos e não genéticos/ambientais (GARAGIOLA *et al.*, 2018). Além da gravidade da hemofilia, a mutação do gene F8 e o histórico familiar são considerados fatores de risco de desenvolvimento de inibidores bem estabelecidos na literatura (EHRENFORTH *et al.*,1992; KREUZ *et al.*,1992). Outros fatores genéticos associados ao desenvolvimento de inibidores são as moléculas de antígeno leucocitário humano (HLA) classe II e a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, tais como, IL-1, IL-2, IL-10, TNF- $\alpha$  e CTLA4 (HAY *et al.*,1997; ASTERMARK *et al.*, 2006). Entre os fatores ambientais, observa-se que o tipo de FVIII utilizado (derivado de plasma ou recombinante), a primeira exposição ao FVIII, frequência e intensidade do tratamento de reposição do FVIII, além de sinais originados a partir

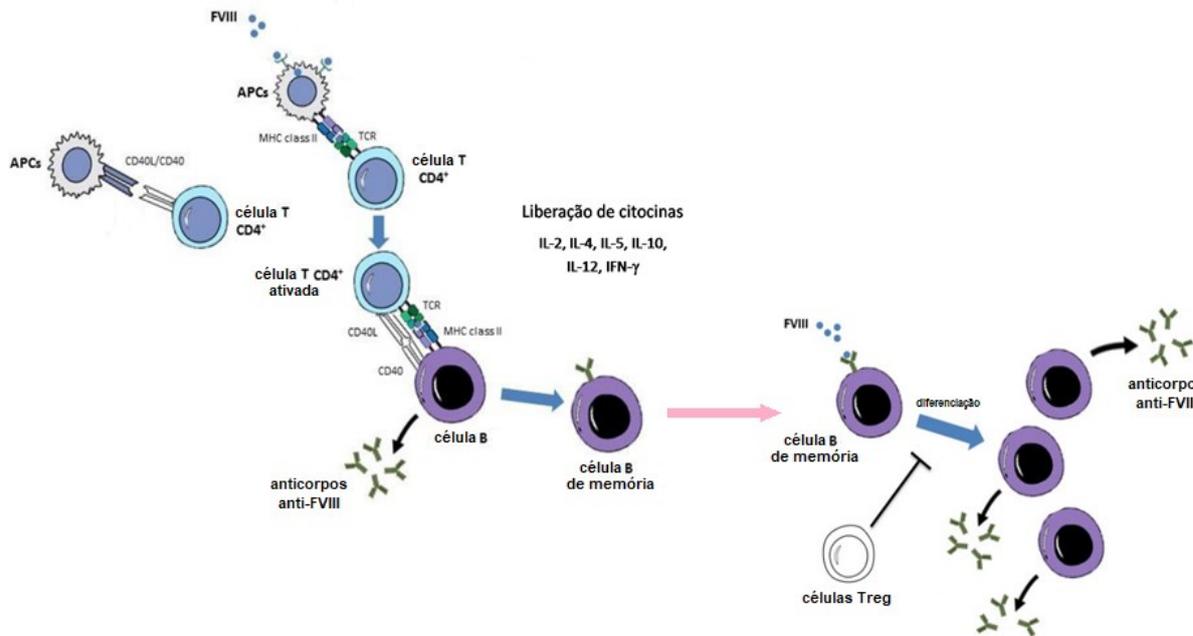
de cirurgias, hemorragias graves, vacinas e infecções estão associados ao desenvolvimento de inibidores em pacientes com hemofilia A (MANNUCCI & RUGGERI, 1970; LUSHER & SALZMAN, 1990; PEERLINCK *et al.*, 1993).

### 1.3 Mecanismos moleculares na geração de anticorpos anti-FVIII

Os inibidores de FVIII são anticorpos policlonais do tipo IgG, principalmente da subclasse IgG4 e IgG1, produzidos por linfócitos B estimulados por células T CD4<sup>+</sup> específicas para o FVIII. Os epítomos reconhecidos pelos anticorpos inibidores do FVIII concentram-se nos domínios A2, A3 e C2 do FVIII (RICK *et al.*, 2003; CHAVES *et al.*, 2008).

O primeiro contato do FVIII infundido ocorre provavelmente no baço, que contém três tipos principais de células apresentadoras de antígenos (APC): macrófagos, linfócitos B e células dendríticas (DC) (TIEU *et al.*, 2020). Além disso, órgãos secundários como os linfonodos e a medula óssea podem estar envolvidos na formação de anticorpos (FEUERER *et al.*, 2003). Na resposta primária (Figura 3), o antígeno - fator infundido - se liga à superfície das APC, internaliza-se por endocitose e é degradado proteoliticamente. Os peptídeos ligam-se ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II a partir da sequência de reconhecimento. Em seguida, o complexo é transferido para a superfície celular, de onde pode interagir com o receptor de células T (TCR) nas células T *helper* CD4<sup>+</sup>. Para a indução das células T em repouso, é necessário o reconhecimento do complexo peptídeo/MHC-II pela célula T através do TCR que é potencializada por sinais co-estimulatórios, como CD80 (B7.1) / CD86 (B7.2) ao CD28, para obtenção de uma reação imune ideal. Após a estimulação antigênica das células T CD4<sup>+</sup>, estas se diferenciam em subconjuntos de células T, Th1 e Th2, para a secreção de citocinas. As células Th2 produzem citocinas anti-inflamatórias ou reguladoras, como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que promovem a ativação de células B, mediam a resposta humoral, regulam a ativação das APC e das células Th1, ao reduzir a intensidade da resposta imune. Além disso, as citocinas secretadas pelas células Th2 também mediam a troca de classe característica da imunoglobulina (Ig) para IgG4, principal subclasse dos anticorpos inibidores. Essas interações levam à estimulação, diferenciação e expansão clonal das células B produtoras de anticorpos anti-FVIII (ASTERMARK, 2006).

Na resposta secundária, as células B de memória que reconhecem especificamente o FVIII são prontamente estimuladas sob nova exposição ao FVIII exógeno, se diferenciam e geram clones celulares secretores de anticorpos (Figura 3).



**Figura 3: Resposta imune primária e secundária e o desenvolvimento de inibidores em pacientes com hemofilia A.** O fator VIII exógeno infundido liga-se às APC. Os peptídeos se ligam ao MHC-II. Os complexos MHC-peptídeo FVIII são então transferidos para a membrana celular e apresentados aos receptores da célula T (TCR) nos linfócitos Th CD4<sup>+</sup>. Sinais co-estimulatórios fornecidos na superfície da célula Th levam à ativação completa dos linfócitos Th e estimulam a liberação de citocinas. A ação potencializada das citocinas e moléculas co-estimulatórias, incluindo a interação entre CD40 e CD40L, induz a proliferação e diferenciação de células B com a produção de anticorpos anti-FVIII, além da geração de células B de memória. Após nova exposição ao FVIII exógeno, as células B de memória se diferenciam e geram clones produtores de anticorpos inibidores. Fonte: Adaptado de (TIEU *et al.*, 2020)

As células T reguladoras (Tregs) podem desempenhar um papel fundamental para evitar a formação de inibidores (CAO *et al.*, 2009). As células Treg representam uma subpopulação de linfócitos T importantes para a manutenção da tolerância. Elas conseguem suprimir mecanismos dependentes do contato celular envolvendo as APC ou inibir a secreção de citocinas (TANG & BLUESTONE, 2008). Com isso, a formação de inibidores, que é uma resposta T dependente, é inibida. Em particular, células Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>, de ocorrência natural ou induzida, promovem a supressão de anticorpos e de respostas de linfócitos T citotóxicos específicos ao FVIII. Em modelos animais, a exposição crônica do sistema

imunológico ao FVIII levou à indução de Treg, e em condições não inflamadas, a falta de Th impediu a diferenciação de células B em células produtoras de anticorpos (CAO *et al.*,2009). Os mecanismos de indução das células Treg envolvem diversas vias, moléculas e processos.

A exposição frequente ao fator deficiente na ausência de inflamação sistêmica pode induzir Tregs com uma subsequente falta de células T auxiliares, impedindo a diferenciação de células B e promovendo tolerância por anergia e/ou exclusão de células Th2 ativadas (TIEU *et al.*,2020).

#### **1.4 Tratamento de pacientes com hemofilia A**

O tratamento da hemofilia A requer infusões frequentes de fatores de coagulação exógenos para substituir o FVIII endógeno que está ausente ou deficiente.

Os fatores de coagulação podem ser obtidos a partir do fracionamento do plasma humano coletado de doadores de sangue, ou por meio de técnica de engenharia genética (produtos recombinantes). Antes de 1980, os produtos disponíveis para o tratamento eram o crioprecipitado e o plasma fresco congelado. Posteriormente, foram produzidos os concentrados de fator de origem plasmática, a partir do fracionamento do plasma humano. Em seguida, se empregaram as técnicas de engenharia genética para a produção do concentrado de fator recombinante (rFVIII). Em 1987, o primeiro paciente foi tratado com o rFVIII, sem a necessidade de nenhum tipo de plasma para a sua produção (CASTRO *et al.*,2014).

Existem duas modalidades de tratamento da hemofilia, sob demanda (episódico) ou profilático (caráter preventivo) que são definidas pela periodicidade da reposição dos fatores de coagulação. O tratamento sob demanda é realizado após a ocorrência de episódio hemorrágico, com a infusão do FVIII. O tratamento de profilaxia consiste no uso regular de concentrado do FVIII para a manutenção dos níveis elevados, a fim de prevenir possíveis episódios de hemorragia. Além disso, existe a profilaxia intermitente que pode ser realizada em um curto período de tempo. Por isso, a profilaxia tornou-se a conduta padrão no atendimento de pacientes com hemofilia grave, pois apresenta melhora na qualidade de vida destes quando comparados aos pacientes que utilizam o fator apenas sob demanda (MANCO-JOHNSON *et al.*, 2007). Na Tabela 1 são apresentadas as definições das modalidades de tratamento possíveis para a reposição do FVIII. A administração das doses de FVIII, concentração e frequência variam de acordo com a gravidade da hemofilia, tipo de hemorragia e peso do paciente (BRASIL, 2015).

**Tabela 1: Definições das modalidades de tratamento de reposição de FVIII**

<b>Modalidade de tratamento</b>	<b>Definição</b>
Episódico (sob demanda)	Tratamento de reposição de fator no momento de evidência clínica de sangramento
<b>Profilaxia contínua</b>	
Profilaxia primária	Reposição regular contínua <sup>1</sup> com início antes de evidências de alteração osteocondral <sup>2</sup> e iniciada antes da segunda hemartrose e idade até 3 anos
Profilaxia secundária	Reposição regular contínua <sup>1</sup> com início após 2 ou mais hemartroses e antes da evidência de alteração osteocondral <sup>2</sup>
Profilaxia terciária	Reposição regular contínua <sup>1</sup> com início após evidência de alteração osteocondral <sup>3</sup>
<b>Profilaxia intermitente</b>	
Periódica ou de curta duração	Tratamento utilizado com o objetivo de prevenir sangramentos. Realizado com período inferior a 45 semanas ao ano

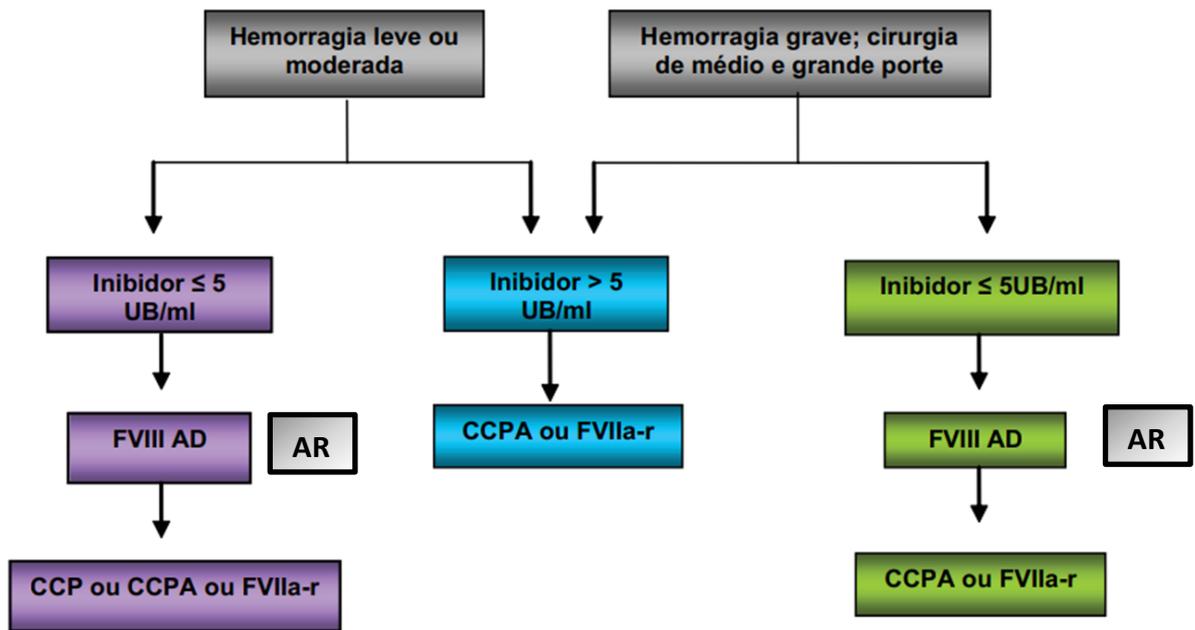
<sup>1</sup>Reposição regular contínua é definida como reposição com intenção de tratar por 52 semanas ao ano e tendo sido tratado por pelo menos 45 semanas ao ano (85% da intenção de tratar)

<sup>2</sup>Determinada por meio de exame físico e/ou testes de imagem

<sup>3</sup>Determinada por meio de exame físico e radiografia simples da(s) articulação(ões) afetada(s)

Fonte: Srivastava *et al.* (2013) e Blanchette *et al.* (2014).

O tratamento dos pacientes com hemofilia A com inibidores é considerado um grande desafio para a clínica, pois apresenta elevados custos sociais e econômicos para o controle dessa condição. Para os pacientes com hemofilia A grave e inibidores persistentes de alta resposta recomenda-se a utilização de agentes *bypass* para o tratamento das hemorragias. Os agentes *bypass* disponíveis são: concentrados de complexo protrombínico ativado (CCPA) e o FVII recombinante ativado (FVIIa-r). Esses produtos fazem uma “ponte” ao ativar diferentes pontos da via de coagulação. Na última década, ambos agentes estão disponíveis para o tratamento e prevenção de sangramentos em pacientes com inibidores, entretanto, a eficácia, a segurança e o custo-benefício ainda são pouco conhecidos em longo prazo (COPPOLA *et al.*; 2018). A Figura 4 mostra um fluxograma com as distintas abordagens para o tratamento dos episódios hemorrágicos dos pacientes com hemofilia A e presença de inibidores.



**Figura 4: Fluxograma para o tratamento de pacientes com hemofilia A e inibidores.**

Abreviações: UB: unidades de Bethesda; FVIII AD: fator VIII em altas doses; AR: ausência de resposta; CCP: concentrado de complexo protrombínico; CCPA: concentrado de complexo protrombínico parcialmente ativado; FVIIa-r: fator VII ativado recombinante. Fonte: Adaptado BRASIL, 2009.

O tratamento utilizado para eliminação dos inibidores é realizado através da indução de tolerância imunológica (ITI) que é indicada para todos os pacientes com hemofilia A grave com inibidor persistente e ativo (COLLINS *et al.*; 2012). A ITI consiste basicamente em infusões recorrentes (diariamente ou diversas vezes na semana) durante vários meses, até anos, com altas ou baixas doses de concentrado de FVIII, com a finalidade de desenvolver uma tolerância ao FVIII infundido, ou seja, treinar o sistema imunológico para aceitar o tratamento com o fator de coagulação ausente, sem a produção de anticorpos (ROCINO; FRANCHINI; COPPOLA, 2017; COPPOLA *et al.*; 2018; WFH; 2018).

O protocolo da ITI pode ser composto por combinações de doses (baixas ou altas) e frequência variável na utilização de concentrado de FVIII. O regime de altas doses apresenta vantagem de menos episódios hemorrágicos e menor tempo de tolerância, entretanto, possui um custo muito maior. Evidências apontam que pacientes com fatores prognósticos ruins (título >10 UB/mL e histórico de título >200 UB/mL) se beneficiam mais com regimes de altas doses (HAY & DIMICHELE, 2012). Diversos protocolos foram descritos e são eficazes: as taxas de sucesso da ITI são de 100% para pacientes com inibidores de baixa resposta (<5 UB/mL) e baixo

impacto clínico na farmacocinética do FVIII/sangramento, enquanto podem variar entre 60% e 90% para pacientes com inibidores de alta resposta (>5 UB/mL) (BRACKMANN *et al.*, 2018).

Novas terapias vêm surgindo para tratar pacientes com hemofilia A com ou sem desenvolvimento de inibidores, baseados no uso de anticorpos monoclonais ou RNA de interferência, tendo como alvos proteínas ou seus genes participantes da cascata de coagulação (PASI *et al.*, 2017; WFH; 2018; MAHLANGU *et al.*, 2018). Por exemplo, o Emicizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado (IgG4), bi específico, recombinante, que se liga o fator IX ativado e ao fator X, mimetizando a ação do FVIII ativado que está ausente. Assim, a cascata de coagulação continua e promove a formação do coágulo, sem induzir o desenvolvimento de inibidores diretos contra o FVIII (SHIMA, 2015). Em estudo publicado por Oldenburg e colaboradores (2007), pacientes que utilizaram Emicizumabe apresentaram 87% menos sangramentos comparados aos pacientes sem profilaxia. Ainda em testes clínicos, o Concizumab é outro anticorpo monoclonal humanizado com alta afinidade para o FXa, capaz de promover a geração de trombina no plasma com fator FVIII deficiente (WATERS *et al.*, 2017).

Além desses fármacos, a terapia gênica também pode ser utilizada para o tratamento da hemofilia. A técnica se baseia na infusão de um vetor de vírus adeno-associado (AAV) com um gene responsável pela síntese do FVIII. O estudo desenvolvido por Rangarajan e colaboradores (2017) mostrou que seis em sete participantes apresentaram nível de atividade do FVIII normal e sustentada pelo período de um ano, após receber a dose mais elevada do vetor recombinante com FVIII.

### **1.5 Complicações clínicas em pacientes com hemofilia A**

Existem complicações clínicas decorrentes da hemofilia A, como a artropatia hemofílica, que consiste numa inflamação progressiva e irreversível do tecido sinovial, e lesões degenerativas da cartilagem, devido à presença de sangue nas articulações. Estas ocorrem principalmente nas articulações dos joelhos, dos tornozelos, dos cotovelos e coxofemorais. Além disso, existem outras complicações que podem interferir no tratamento da hemofilia A, como por exemplo, o desenvolvimento de inibidores contra o FVIII, que foram discutidos previamente, e as infecções transmitidas por transfusão (BRASIL, 2015).

### **1.5.1 Infecção pelo HCV em pacientes com hemofilia**

Na década de 1980, a transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite B (HBV) e vírus da hepatite C (HCV), pelo uso de hemocomponentes e hemoderivados, resultava em complicações graves decorrentes do tratamento dos pacientes com hemofilia (BRASIL, 2015).

Os pacientes com hemofilia apresentam uma alta prevalência de infecção pelo HCV devido ao uso de fator de coagulação, pois este era derivado do plasma e não passava pelo processo de inativação viral (WATSON *et al.*, 1992). As pessoas que receberam transfusão de sangue e/ou derivados antes de 1992/1993, quando o teste para HCV na triagem do doador de sangue ainda não estava disponível, são aquelas que apresentavam maior risco de infecção pelo HCV (ALTER, 2007). Nesse contexto, os pacientes com hemofilia eram uma população de risco de infecção pelo HCV pela transmissão por hemocomponentes contaminados. Nesse período, acredita-se que 50 a 90% dos pacientes com hemofilia estivessem infectados pelo HCV em todo o mundo. A prevalência cresce com a faixa etária, pois os pacientes mais velhos receberam inúmeras transfusões sanguíneas e hemocomponentes não testados para HCV (CZEPIEL *et al.*, 2008). Nos Estados Unidos, 90% das pessoas com hemofilia que usaram fator de coagulação antes de 1987 foram expostos ao HCV pelo uso de produtos contaminados. Já no Brasil, entre os anos 1960 a 1991, estima-se que 5 a 15% dos receptores de hemocomponentes da população geral foram infectados com HCV (MARTINS *et al.*, 2011). Na Fundação Hemominas (FH), entre 1985 a 1997, a soroprevalência para HCV (ELISA anti-HCV positivo) foi de 44,6% nos pacientes com hemofilia e 71,6% deles apresentavam viremia (CARMO *et al.*, 2002).

### **1.6 Epidemiologia da infecção pelo HCV**

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 71 milhões de pessoas viviam com HCV em 2015, com prevalência global de 1%. Observa-se uma distribuição heterogênea entre os diversos países, sendo que a região oriental do mediterrâneo apresenta uma maior prevalência (2,3%), seguida da Região Europeia (1,5%). As menores taxas de prevalência são encontradas na região do Sudeste Asiático, região do Pacífico Ocidental e nas Américas (WHO, 2017).

Na população adulta (>15 anos) da América Latina estima-se uma prevalência de anti-HCV entre 0,9% a 1,2%. A prevalência de anti-HCV na Argentina é de 1,5%, variando entre 0,5% a 2,5%, com viremia de 80%. O Peru apresenta uma prevalência de 1,2% de anti-HCV, variando

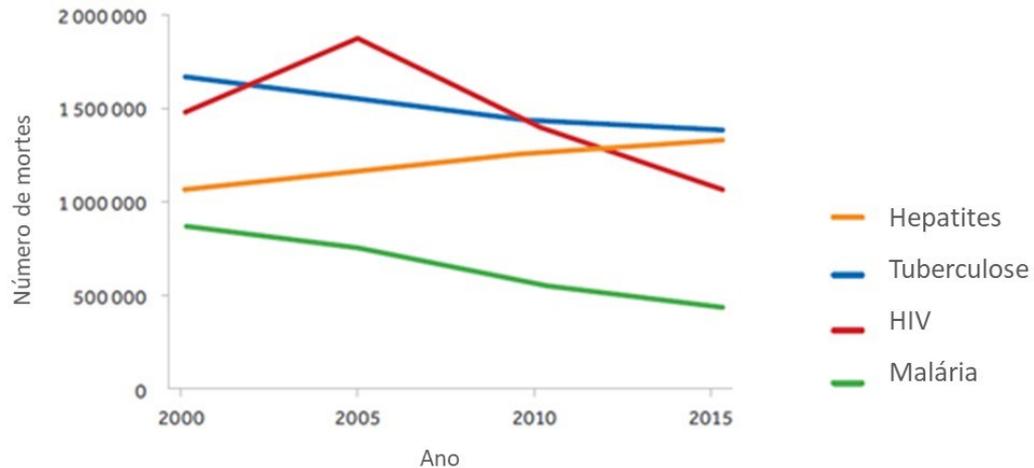
de 0,4% a 1,6%, enquanto que no México a taxa é de 1,4%, com variação de 1,1% a 1,6% de anti-HCV (revisto por GOWER *et al.*,2014).

Em relação ao território brasileiro, estudo mostra uma taxa de prevalência geral de 1,6%, com variação entre 1,1% a 1,6% de anti-HCV positivo (revisto por GOWER *et al.*,2014). Outro estudo aponta uma prevalência nacional similar, entre 0,9% a 1,9% (XIMENES *et al.*,2010). Essas soroprevalências variam entre as regiões, com uma taxa de 5,8% na região Amazônica (EL KHOURI *et al.*,2010), de 1,5% em Salvador (ZARIFE *et al.*,2006) e de 1,4% na cidade de São Paulo (FOCACCIA *et al.*,1998).

Segundo o Boletim Epidemiológico das Hepatites Virais (2019), entre os anos de 1999 a 2018, foram notificados no Brasil 174.703 casos de hepatite C considerando simultaneamente ambos os marcadores de infecção: anti-HCV e HCV-RNA. Entretanto, a partir de 2015, os casos passaram a ser notificados apenas com um dos marcadores, e dessa forma, observou-se elevação para 359.673 casos durante o período citado previamente. Diante desse quadro, observa-se uma tendência à elevação na taxa de notificação a partir de 2015. Entre os anos de 1999 e 2018, a distribuição dos casos considerando os dois marcadores sorológicos é de 63,1% no Sudeste, 25,2% no Sul, 6,1% no Nordeste, 3,2% no Centro-Oeste e 2,5% no Norte. Contudo, em 2018, os casos com anti-HCV ou HCV-RNA reagentes apontaram uma taxa de detecção maior na região Sul, com 26,8 casos para cada 100 mil habitantes, seguida pelo Sudeste (16,0), Norte (5,7), Centro-Oeste (5,7) e Nordeste (4,0) (BRASIL, 2019). Esses dados mostram que o vírus da hepatite C ainda continua em circulação na população brasileira, sendo que, atualmente, a incidência maior pode ser observada na região sul do país, devido à maior taxa de detecção dos casos.

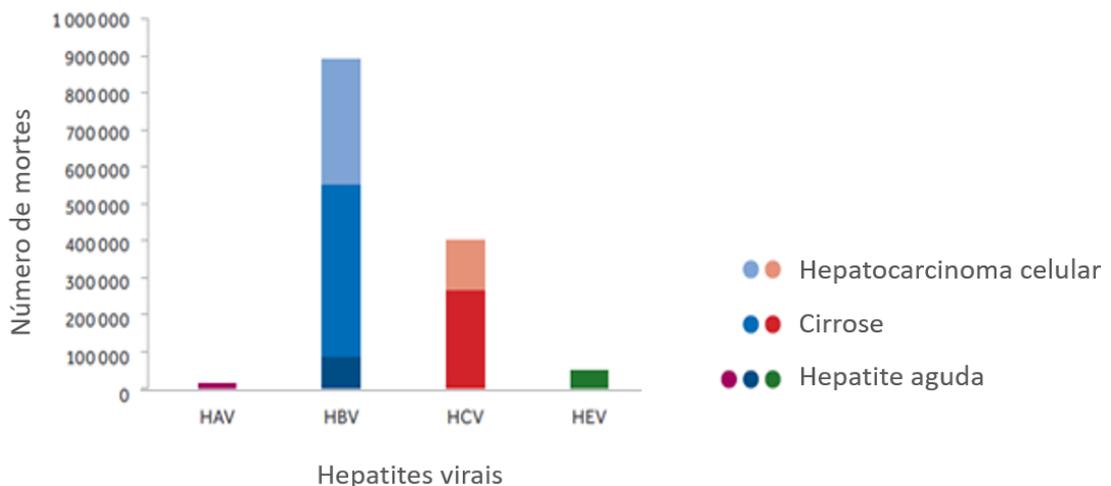
Segundo a OMS (2017) as hepatites virais são responsáveis por 1,34 milhões de mortes em 2015, semelhantes aos casos relacionados à tuberculose (1,37 milhões de mortes, sem associação com o HIV), enquanto que a infecção pelo HIV e a malária causam 1,06 milhões e 0,44 milhões de óbitos, respectivamente. Entre 2010 a 2015, houve uma tendência de

crescimento do número de mortes relacionadas com hepatites, contrária à tendência de queda observada para as mortes relacionadas com tuberculose, HIV e malária (Figura 5).



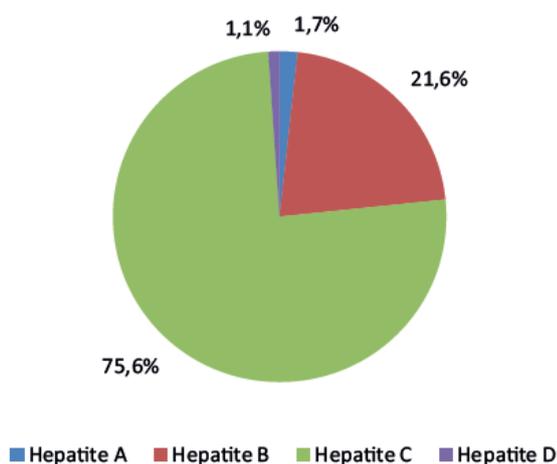
**Figura 5: Mortalidade global de hepatites virais, HIV, tuberculose e malária entre 2000-2015.** Fonte: (WHO, 2017)

Em relação às mortes por hepatites virais, 96% são decorrentes de complicações das hepatites B e C, sendo que 30% são relacionadas diretamente ao HCV. Em pacientes com estágio avançado, as mortes são associadas com cirrose ou carcinoma hepatocelular (Figura 6). Embora alarmantes, acredita-se que esses dados ainda possam estar subestimados, devido à notificação incompleta dos óbitos (WHO, 2017).



**Figura 6: Causas de óbitos por hepatites virais.** Fonte: (WHO, 2017)

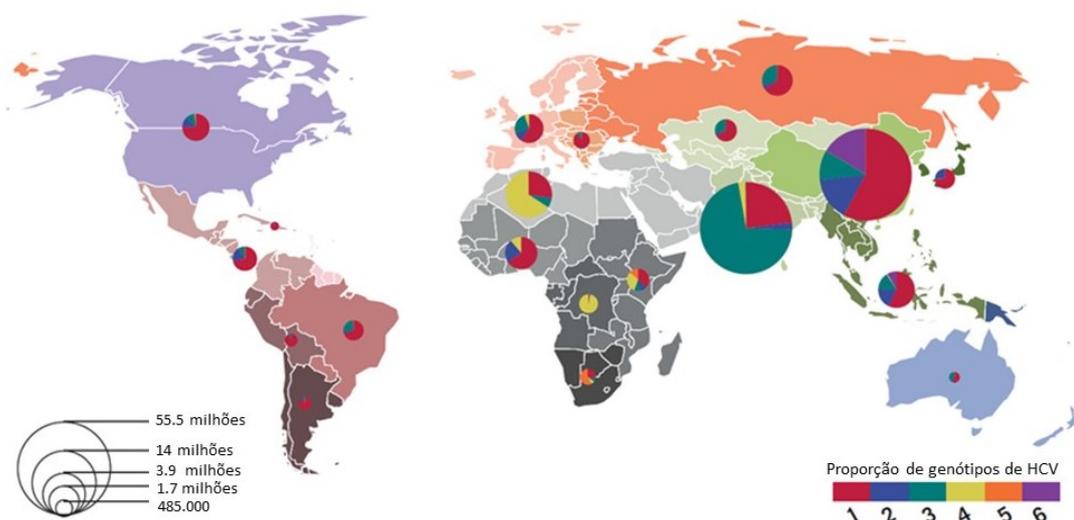
O Sistema de Informação de Mortalidade (SIM) do Ministério da Saúde informou, entre o período de 2000 a 2015, 61.297 óbitos associados às hepatites virais, com predomínio de 75,6% devido à hepatite C (Figura 7) (BRASIL, 2017a).



**Figura 7: Distribuição dos óbitos associados às hepatites virais no Brasil, entre 2000-2015.** Fonte: (BRASIL, 2017a)

### 1.7 Distribuição geográfica dos genótipos do HCV

O HCV apresenta grande variabilidade genética devido ao fato da RNA polimerase dependente de RNA não possuir atividade revisora. Portanto, existem diversos genótipos e subtipos cuja variabilidade em sua sequência nucleotídica está entre 30 a 35% (BRASIL, 2015). Smith e colaboradores (2014) apresentam a nova classificação do Vírus da Hepatite C em 7 genótipos e 67 subtipos distribuídos em todo o mundo. O genótipo 7 foi isolado no Canadá de um imigrante originário da África central (SMITH *et al.*, 2014). A distribuição por regiões geográficas dos genótipos de HCV e sua prevalência relativa são mostradas na Figura 8.



**Figura 8: Distribuição global dos genótipos do HCV.** O diâmetro dos gráficos é proporcional ao número de casos soropositivos para HCV. Fonte: MESSINA *et al.*,2015.

O genótipo 1 do HCV é o mais prevalente em todo o mundo, representando 46,2% dos casos, ou seja, 83,4 milhões de pessoas infectadas, dos quais 1/3 localiza-se no leste asiático. O genótipo 3 é o segundo mais prevalente (54,3 milhões de pessoas, 30,1% dos casos). Esses genótipos encontram-se na grande maioria dos países, independentemente da situação econômica. Já os genótipos 2, 4 e 6 são responsáveis por um total de 22,8% de todos os casos, e o genótipo 5 corresponde a menos de 1%. Entretanto, as maiores proporções dos genótipos 4 e 5 estão localizados em países de baixa renda (MESSINA *et al.*,2015).

A distribuição geográfica dos genótipos do HCV é complexa. Existem subtipos, tais como 1a, 1b, 2a e 3a, que são encontrados globalmente e que correspondem à grande proporção de infecções por HCV em países de alta renda. Isto se deve à epidemia que se alastrou rapidamente via transmissão pelo sangue e hemocomponentes infectados nas décadas anteriores à descoberta do HCV. Além disso, a migração humana, influenciada pela tendência histórica, corrobora a prevalência das linhagens encontradas na África Ocidental e nas Américas (SMITH *et al.*,2014; MESSINA *et al.*,2015).

No Brasil, são encontrados os genótipos 1, 2, 3, 4 e 5, cujas frequências foram de 64,9% para o genótipo 1, 4,6% para o genótipo 2, 30,2% para o genótipo 3, 0,2% para o genótipo 4 e 0,1% para o genótipo 5 (CAMPIOTTO *et al.*,2005).

## 1.8 Estrutura viral e organização genômica do HCV

De acordo com o ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*), a espécie viral que causa a hepatite C é a *Hepacivirus C*, pertencente ao gênero *Hepacivirus* e à família *Flaviridae*. O *Hepacivirus C*, conhecido como HCV (vírus da hepatite C), apresenta um genoma constituído por uma única molécula de RNA senso positivo, com aproximadamente 9.600 bases (9,6 Kb). A partícula viral possui tamanho entre 55 a 65 nm, possui um envelope lipoproteico, onde estão inseridas as glicoproteínas do envelope e um capsídeo proteico, o qual envolve o genoma viral (STUART *et al.*, 2013). A Figura 9 ilustra a estrutura da partícula viral, a organização do genoma e as funções das proteínas codificadas.

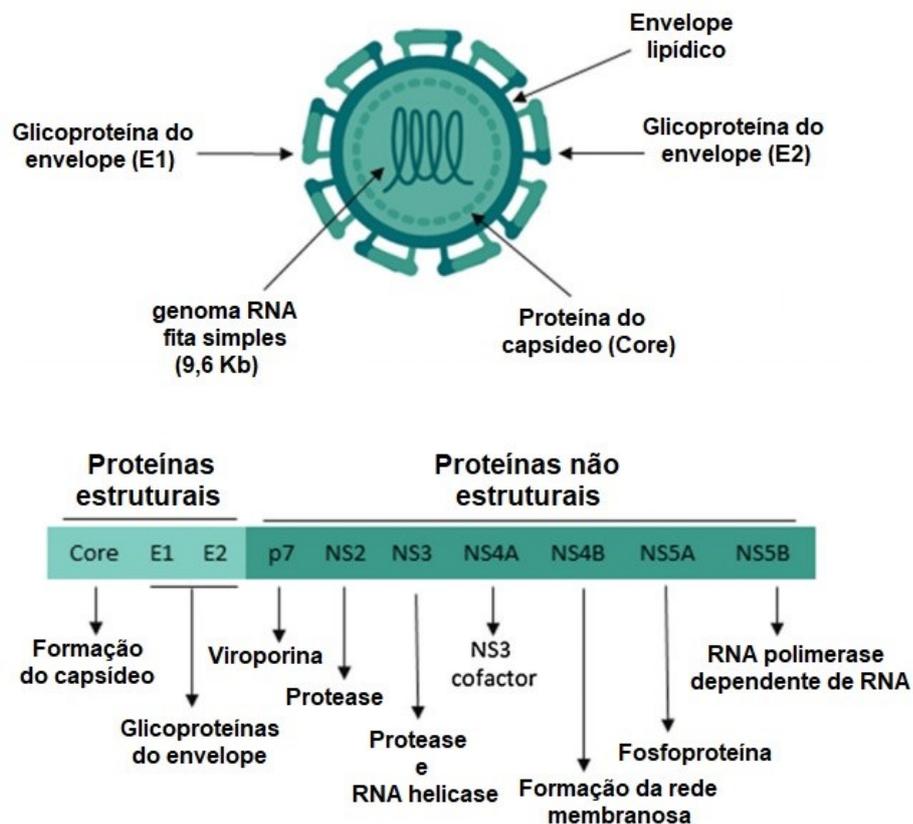


Figura 9: Estrutura da partícula do HCV e função das suas proteínas. Fonte: SALAMA *et al.*, 2019.

O genoma viral do HCV apresenta uma janela de leitura aberta (do inglês *open reading frame*) longa e única com 3006-3037 códons, a qual é traduzida em uma poliproteína que é clivada em dez produtos gênicos. Nas porções 5' e 3' são encontradas regiões não traduzidas (NTR) que

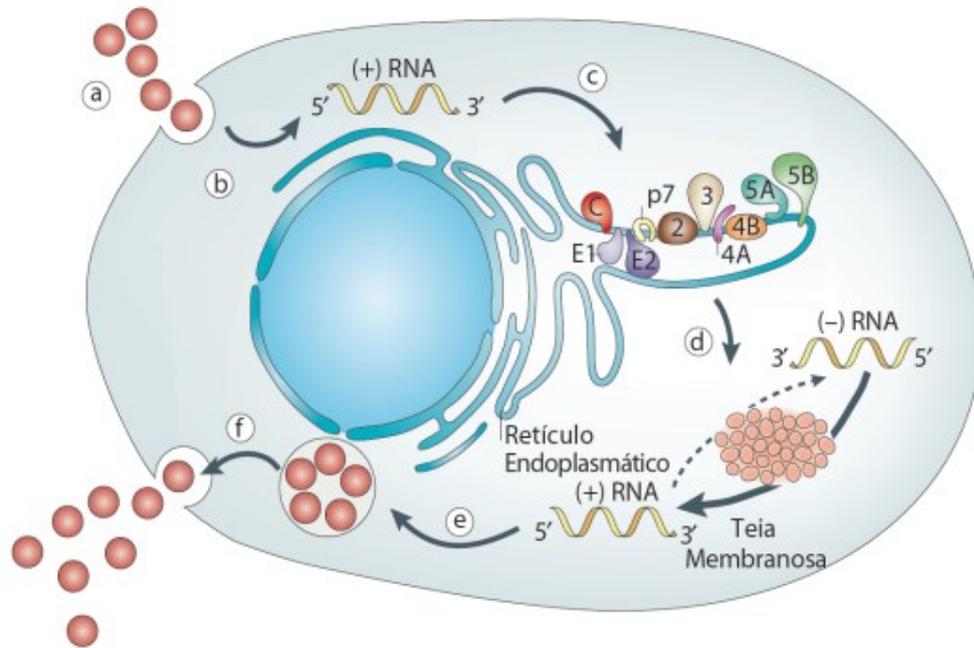
originam estruturas secundárias específicas que são necessárias para replicação e tradução do genoma (SIMMONDS *et al.*, 2017).

O genoma viral é traduzido através de um sítio interno de entrada do ribossomo, do inglês *internal ribosome entry site* (IRES) como uma poliproteína que é processada para a produção de dez produtos gênicos (Figura 9). As proteínas estruturais são codificadas pela região amino-terminal e incorporadas na partícula viral. A proteína do capsídeo (core) compõem o nucleocapsídeo. Já as glicoproteínas do envelope viral (E1 e E2) estão relacionadas com a adsorção e fusão do vírus aos receptores na célula-alvo para indução da infecção viral (LINDENBACH & RICE, 2013). As proteínas não estruturais, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B, são responsáveis por coordenar os aspectos intracelulares da replicação do HCV, como a síntese de RNA, modular mecanismos de defesa do hospedeiro e montagem da partícula viral. A proteína do canal iônico, p7, a qual é derivada da clivagem de E2 e NS2, tem a função de clivar a junção NS2/NS3, necessária para a montagem do vírus. A NS3 é uma proteína multifuncional que contém uma função de protease N-terminal e de uma RNA helicase na porção C-terminal, cuja função não está completamente conhecida, mas já se sabe que a helicase atua na montagem das partículas virais. A NS4 apresenta duas proteínas chamadas NS4A e NS4B, sendo que a NS4A atua como um cofator para a atividade protease ao interagir com a protease NS3, e a NS4B tem papel na reorganização do retículo endoplasmático para formação da rede membranosa, local onde ocorre a replicação viral. NS5A apresenta-se como dímero, que não é observado nas demais proteínas do HCV. Por fim, a NS5B é a principal enzima responsável por catalisar a replicação do RNA viral, sendo uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (STUART *et al.*, 2013). A RdRp do HCV não apresenta atividade revisora, e devido a isso o HCV apresenta grande variabilidade genética, podendo ser classificado em diversos genótipos e subtipos. A identificação e caracterização bioquímica da protease NS3/NS4A e da enzima viral NS5B (RdRp) foram fundamentais para o desenvolvimento de novos tratamentos ao HCV, pois são alvos da terapia antiviral (BARTENSCHLAGER *et al.*, 2013).

### **1.9 Ciclo de multiplicação do HCV**

A multiplicação do HCV ocorre principalmente nos hepatócitos. Essas células apresentam um tropismo favorável a substâncias de baixa densidade lipoproteica e isto é fundamental para a

adsorção e internalização viral. Na Figura 10 são representadas as etapas que ocorrem no ciclo de multiplicação viral.



**Figura 10: Ciclo de multiplicação do HCV.** (a) contato e internalização do vírion na célula; (b) liberação do RNA viral no citoplasma; (c) tradução mediada por IRES e processamento da poliproteína viral; (d) replicação do RNA viral; (e) empacotamento do RNA viral e montagem da partícula; (f) maturação do vírion e liberação da célula. Fonte: Adaptado de MORADPOUR *et al.*, 2007.

As glicosaminoglicanas (GAGs) e o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL-R) interagem com as proteínas do envelope viral ou com lipoproteínas dos vírions, tais como ApolipoproteínaB/E, promovendo a adsorção viral. Após a fixação, as partículas virais interagem com quatro fatores celulares para promover a penetração viral: o receptor de classe B tipo I (SR-BI), a tetraspanina (CD81), a clatrina-1 (CLDN1) e a ocludina (OCLN). A primeira interação ocorre entre a glicoproteína do envelope viral E2 e SR-BI. Também ao CD81 se liga fortemente a proteína E2, e isso pode contribuir para a desregulação do sistema imune de pacientes com infecção crônica. As proteínas CLDN1 e OCLN são essenciais para as próximas etapas pós-ligação da partícula viral. Elas permitem que as partículas do HCV sejam internalizadas nas junções celulares via endocitose mediada por CLDN1 (Figura 10, etapa a). Para que ocorra o desnudamento do capsídeo é necessário um ambiente acidificado, então o genoma viral é liberado nos endossomas tardios. Após a liberação do genoma de RNA no citoplasma (Figura 10, etapa b), a poliproteína do HCV é traduzida a partir da fita molde de

RNA positiva na membrana do retículo endoplasmático. A tradução é feita por um mecanismo independente de cap, pela sequência de entrada no ribossomo (IRES) localizada na região 5' NTR do genoma viral. Dessa forma, é originada uma poliproteína, de aproximadamente 3.000 aminoácidos que será processada por proteases celulares sendo geradas 10 proteínas virais: capsídeo, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (Figura 10, etapa c).

A proteína viral NS4B e fatores da célula hospedeira induzem a formação de uma rede membranosa, ou seja, um compartimento originado a partir da membrana do retículo endoplasmático que servirá como o principal local de replicação viral. Esse local é composto por vesículas simples, duplas e multi-membranosas, além de gotículas lipídicas. Esse complexo está associado a proteínas virais, componentes celulares do hospedeiro e fitas nascentes de RNA. Na rede membranosa, ocorre a replicação do RNA viral, porém em local não especificado. A síntese de RNA é catalisada pela NS5B, além de outras proteínas NS virais. Após a síntese de um intermediário de RNA fita negativa, múltiplos RNAs progênicos fita positiva são gerados e são usados para a tradução de proteínas e multiplicação das partículas virais (Figura 10, etapa d).

No processo de montagem da partícula viral, a proteína do capsídeo e o RNA viral se acumulam próximo ao retículo endoplasmático e na presença de gotículas lipídicas. O envelope viral é originado por brotamento ao atravessar a membrana do retículo endoplasmático, em um processo relacionado à síntese de lipoproteínas. Nessa etapa (Figura 10, etapa e), E1 e E2 acumulam-se com p7, NS2 e possíveis fatores da célula hospedeira. Na última etapa, as partículas de HCV são liberadas por meio da via secretora (Figura 10, etapa f).

### **1.10 Transmissão, diagnóstico e tratamento do HCV**

Em relação ao mecanismo de transmissão do HCV, acredita-se que em 10 a 30% dos casos não seja possível definir por qual via ocorre a infecção (BRASIL, 2009). Existem diversos fatores de risco que são associados à aquisição da infecção pelo HCV, entre eles, a transfusão sanguínea e o uso de hemoderivados antes da introdução dos testes para HCV na triagem do doador, transplantes de órgãos, utilização de drogas injetáveis, terapias injetáveis não seguras, hemodiálise, transplante de órgãos antes de 1992, exposição ocupacional ao sangue, transmissão perinatal e transmissão sexual (ALTER, 2007). Além disso, procedimentos

estéticos podem ser considerados uma via de transmissão, por exemplo, tatuagens, *piercing*, navalha em barbearia e acupuntura (MARTINS *et al.*, 2011).

Em 1991, Thaler e colaboradores sugerem que o HCV pode ser transmitido verticalmente de mães infectadas para crianças e pode originar uma doença silenciosa e crônica. A taxa de transmissão vertical do HCV varia entre 0 a 20%, com média de 5%. Essa variação ocorre devido a fatores de risco para a transmissão vertical, como carga viral elevada da mãe, dificuldade no parto e coinfeção HIV-HCV (BENOVA *et al.*, 2014). As mães coinfectadas apresentam quase quatro vezes mais chance de transmitirem o HCV aos filhos (GIBB *et al.*, 2000). Já o aleitamento materno não contribui de forma significativa para a transmissão do HCV (THALER *et al.*, 1991).

A partir de 1993, são empregados os testes sorológicos (anti-HCV) na triagem obrigatória dos doadores de sangue para o HCV nos hemocentros brasileiros (BRASIL, 2015). Para reduzir a janela imunológica, período em que os anticorpos ainda não são suficientes para serem detectados pelos testes sorológicos, é acrescentado na triagem do doador de sangue, em todo o território nacional, o teste de ácido nucleico (NAT) para HCV (juntamente com HIV) a partir de 2014 (Portaria nº 2.712 de 12 de novembro de 2013). A introdução do NAT leva à redução da janela diagnóstica do HCV de 70 dias (considerando-se testes de ELISA de 3ª geração) para 10 dias, fato considerado importante, visto que o risco de transmissão da infecção por HCV por transfusão de sangue contaminado é de 90% (DODD *et al.*, 2009). Atualmente, com a implementação dos testes sorológicos e NAT para detecção da infecção pelo HCV em doadores de sangue, a via de transmissão por transfusão sanguínea foi reduzida drasticamente.

O principal método de diagnóstico para o HCV é a sorologia para detecção de anticorpos anti-HCV, através dos imunoenaios que se aperfeiçoam com o decorrer dos anos. O teste molecular é empregado para a detecção do material genético do vírus, usando-se PCR (reação em cadeia da polimerase) qualitativa ou quantitativa. Os testes sorológicos e moleculares são fundamentais para se detectar infecção viral passada ou presente pela identificação de anticorpos (anti-HCV) ou viremia (RNA). A presença do RNA viral é detectada no soro após 10-12 dias de infecção. A detecção de antígeno e anticorpos anti-HCV ocorre entre 30 a 60 dias após a exposição ao vírus, quando a ALT (enzima alanina aminotransferase) já apresenta níveis elevados, indicando necrose de hepatócitos. O indivíduo que apresenta um teste anti-HCV reativo e PCR negativo para o HCV pode ser devido a resolução espontânea de uma infecção anterior, resposta virológica sustentada (RVS) após o tratamento, resultado falso-positivo de

anticorpo anti-HCV, ou infecção presente, mas com viremia indetectável. Quando a infecção está presente, o quadro clínico é semelhante àquele decorrente de outros agentes que causam hepatites virais e o diagnóstico diferencial somente é possível com a realização de testes para detecção de anticorpos específicos, antígenos virais ou material genético viral (BRASIL, 2017d).

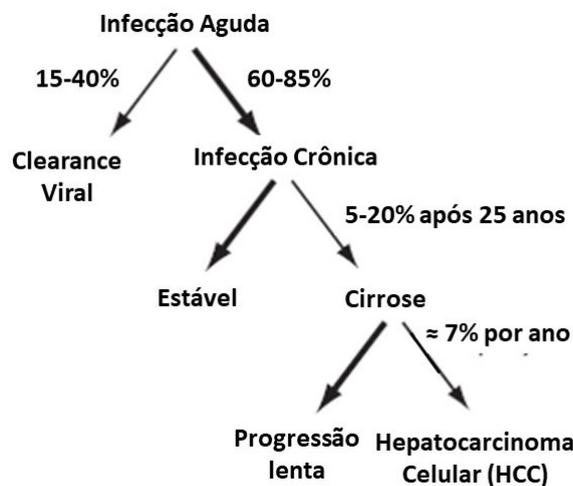
O primeiro tratamento disponível para combater a infecção pelo HCV baseou-se no uso de interferon alfa (IFN- $\alpha$ ), que é uma citocina liberada pelas células hospedeiras ao contato com o patógeno. O IFN- $\alpha$ , tipo I, é capaz de inibir a replicação viral e modular a resposta imune contra as células hepáticas infectadas pelo vírus. Entretanto, as melhores respostas ao tratamento eram associadas ao IFN- $\alpha$  peguilado (pegIFN- $\alpha$ ) e à ribavirina (RBV), que é considerado um inibidor nucleosídeo. Contudo, os regimes de pegIFN- $\alpha$ +RBV apresentam efeitos colaterais significantes e a taxa de cura está entre 40 a 65%, dependendo do genótipo do vírus que infecta o paciente (WHO, 2016). Além disso, a eficácia da resposta ao tratamento com IFN é influenciada por fatores genéticos do hospedeiro. Por exemplo, os polimorfismos rs12979860 e rs8099917 na região do gene IL28B (também chamado de IFN $\lambda$ 3) são considerados marcadores de resposta ao tratamento para HCV com uso do IFN (BELLANTI *et al.*, 2012).

Em 2011, foram disponibilizadas novas drogas para o tratamento da infecção crônica pelo HCV, conhecidas como antiviral de ação direta, do inglês *direct-acting antiviral* (DAA). Estes fármacos apresentam como alvo três regiões importantes no genoma, tais como, NS3/4A, NS5A e NS5B que são capazes de inibir diretamente o ciclo de replicação do HCV. As DAAs apresentam elevadas taxas de RVS (superiores a 90%) e estão associados a menos eventos adversos graves, podendo serem utilizados em combinações de duas ou três subclasses, administrados de forma oral durante algumas semanas (WHO, 2016).

No Brasil, atualmente todas as pessoas diagnosticadas com hepatite C podem se submeter ao tratamento gratuito disponível pelo Sistema Único de Saúde (SUS), independentemente do dano hepático. Essa normativa encontra-se no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas das Hepatites Virais (2019), do Ministério da Saúde (BRASIL, 2019). A ampliação da assistência é uma estratégia, em conjunto com a OMS, de atingir a meta de eliminar o HCV até 2030 em todo o mundo (WHO, 2017).

### 1.11 História natural da infecção pelo HCV

A hepatite C aguda apresenta uma evolução de uma a duas semanas após o contato com o material genético viral. Além disso, a alanina aminotransferase sérica (ALT) adquire níveis elevados e podem surgir alguns sintomas, como por exemplo, icterícia, náuseas, vômitos, fadiga, febre baixa e dor de cabeça. A hepatite C aguda possui diagnóstico difícil, pois os sintomas, quando ocorrem, são bastante comuns a outras infecções, ou em geral tem evolução subclínica, com 80% dos casos sendo assintomáticos e sem presença de icterícia (VILLANO *et al.*, 1999; THIMME *et al.*, 2001; BRASIL, 2017b).



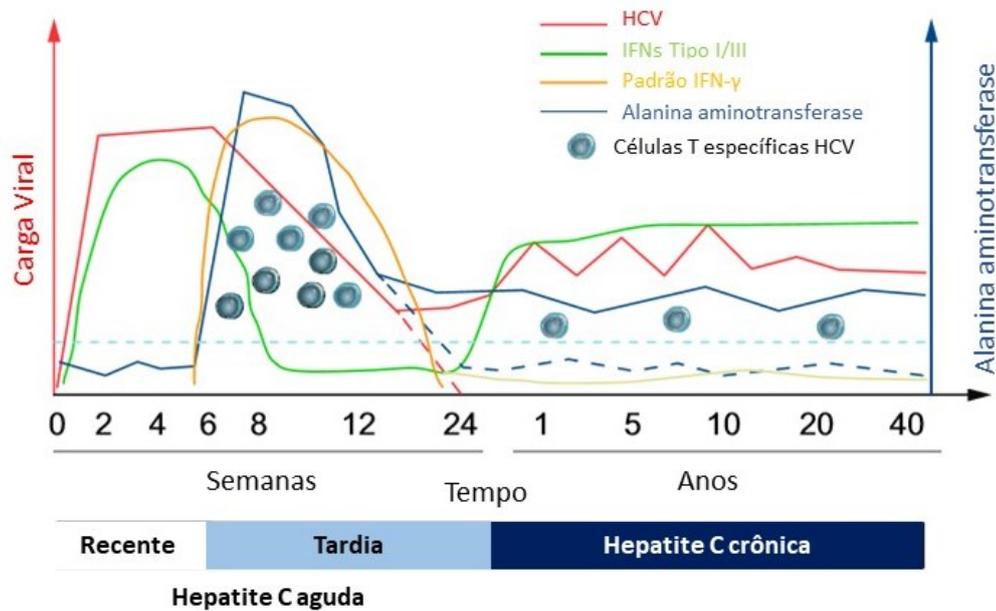
**Figura 11: Progressão da infecção pelo HCV.** Fonte: (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2013).

Como mostrado na Figura 11, 15 a 40% dos pacientes com infecção pelo HCV podem apresentar cura espontânea (*clearance viral*), enquanto que 60% a 85% dos indivíduos desenvolvem uma infecção crônica. Destes, até 20% dos casos podem progredir para cirrose, dos quais a maioria progride lentamente, e 7% podem desenvolver hepatocarcinoma ou descompensação hepática grave. A evolução fatal geralmente decorre de complicações da hepatopatia crônica, tais como insuficiência hepatocelular, hipertensão portal e desenvolvimento de hepatocarcinoma (BRASIL, 2017b).

A diferenciação entre hepatite C aguda e crônica pode ser difícil, como pode haver detecção de RNA viral e de anticorpos anti-HCV em ambas situações, de modo que analisar os níveis das enzimas do fígado (ALT e AST) auxilia também no diagnóstico (SHARMA; FELD, 2014). Na infecção aguda, os sintomas iniciam entre 6 a 20 semanas após a exposição ao HCV e podem

apresentar duração de até 12 meses, mas a resolução geralmente acontece até a 12<sup>a</sup> semana (VILLANO *et al.*,1999; THIMME *et al.*,2001; BRASIL, 2017b).

A hepatite aguda pode ser subdividida em duas fases pela caracterização de marcadores: fase recente, antes da ativação e recrutamento de células T específicas para HCV no fígado, e fase tardia, caracterizada pela resposta imune adaptativa (Figura 12).



**Figura 12: História natural da infecção pelo HCV.** Fonte: Adaptado de HEIM & THIMME, 2014.

Após a infecção, a carga viral aumenta rapidamente e atinge um platô (linha vermelha). Na fase inicial da infecção aguda (4 a 8 semanas), uma resposta imune inata é conduzida por IFNs do tipo I ou III (linha verde) que podem interromper a replicação viral. A partir do recrutamento de células T específicas para HCV no início da fase tardia, o perfil de expressão gênica no fígado muda para um padrão de IFN- $\gamma$  (linha amarela). Ao mesmo tempo, os níveis de ALT aumentam (linha azul) e alguns indivíduos podem apresentar icterícia. Na fase tardia, a replicação viral é fortemente inibida em aproximadamente 30% dos pacientes, nos quais o HCV é completamente eliminado (linha vermelha tracejada) e os níveis de ALT retornam ao normal (linha azul tracejada). Em 70% dos casos, o HCV persiste (linha vermelha sólida) e a ALT permanece elevada (linha azul sólida). Na fase crônica, os infiltrados celulares são encontrados em níveis mais baixos, mas a expressão dos genes estimulados de IFN (ISGs) dirigida por IFN- $\gamma$  desaparece. Entretanto, em aproximadamente metade dos pacientes, há novamente alta

produção dos IFNs tipo I ou III (linha verde). Outros pacientes apresentam pouca ou nenhuma ativação de ISGs no fígado (linha verde clara) (HEIM & THIMME, 2014) (Figura 12).

A eliminação viral espontânea pode variar entre 20 a 40% nos casos de infecção aguda pelo HCV (SHARMA & FELD, 2014). O estudo de Grebely e colaboradores (2014) mostrou que o curso temporal do *clearance* viral espontâneo é variável, pois 34% ocorreu em três meses, 67% em seis meses e 83% em até 12 meses, com um tempo médio de eliminação da infecção de 16,5 semanas, ou seja, menos de três meses após a infecção inicial. É interessante a observação de que geralmente o nível inicial de viremia é maior naqueles que sofrem o *clearance* viral espontâneo em comparação com aqueles que evoluem para infecção crônica (STUART *et al.*, 2013). Existem fatores que são associados à eliminação viral espontânea, tais como, icterícia na fase aguda, níveis elevados de ALT, reatividade para HBsAg (antígeno de superfície do HBV), sexo feminino, idade mais jovem, infecção pelo HCV genótipo 1 e fatores genéticos, como o haplótipo CC do polimorfismo rs12979860 (C/T) em região próxima ao gene IL-28B (KAMAL, 2008; MOSLEY *et al.*, 2008).

Como na grande maioria dos casos a hepatite C é diagnosticada na fase crônica devido à ausência ou inespecificidade de sintomas, a doença pode evoluir durante anos sem diagnóstico. Geralmente, o diagnóstico ocorre em testes sorológicos de rotina ou na intenção do indivíduo de doar sangue.

A hepatite C crônica apresenta diferentes formas de evolução: algumas pessoas infectadas se recuperam completamente, outras apresentam viremia para o HCV sem evolução de lesão hepática e sem alteração nas enzimas hepáticas. Além disso, alguns casos apresentam forma estacionária de hepatite caracterizada por níveis elevados de aminotransferase, sem manifestação de sintomas ou progressão de doença. Outros casos possuem evolução da fibrose para cirrose, alguns têm cirrose estável por longo período, identificada apenas por meio de biópsia hepática, enquanto outros apresentam cirrose progressiva que culmina na insuficiência hepática e por fim, alguns desenvolvem carcinoma hepatocelular (POYNARD *et al.*, 1997). A persistência da infecção pelo HCV pode estar relacionada à grande variabilidade genética do vírus, que permite o escape viral do sistema imune.

## 1.12 Resposta imune desencadeada pelo HCV

### 1.12.1 Resposta imune inata frente ao HCV

O HCV penetra nos hepatócitos humanos através da interação de glicoproteínas do envelope viral com os receptores celulares. Após a entrada do vírus na célula, a replicação viral induz os mecanismos do sistema imune inato do hospedeiro.

O organismo apresenta a imunidade inata como a primeira linha de defesa e diversas células, tais como fagócitos (macrófagos, células dendríticas e neutrófilos), células *natural killer* (NK), células *natural killer* T (NKT), mastócitos, basófilos e eosinófilos podem reconhecer e iniciar o combate ao patógeno, sendo essa resposta chamada de resposta inata. Algumas moléculas, como proteínas do sistema complemento, proteínas da fase aguda, citocinas e quimiocinas são produzidas durante a imunidade inata (CRUVINEL *et al.*, 2010).

As infecções por vírus são detectadas pela via dependente do receptor do tipo *Toll-like* (TLR) e pela via citosólica, desencadeada pela ligação do RNA viral ao RIG-1 (do inglês *retinoic acid-inducible gene-1*) e MDA5 (do inglês *melanoma differentiation-associated protein 5*). Ambas vias ativam os principais fatores de transcrição NF- $\kappa$ B (Fator nuclear kappa B) e o fator regulador de interferon (IRF) 3 e 7. IRF3 e NF- $\kappa$ B ativados se ligam aos elementos de resposta nos promotores dos genes IFN do tipo I e III (HEIM & THIMME, 2014).

A resposta imune inata é importante no controle da infecção pelo HCV, sendo a sinalização via interferon do tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ), tipo II (IFN- $\gamma$ ) e tipo III (IFN- $\lambda$ ) importante nas respostas iniciais desenvolvidas nos hepatócitos frente à infecção pelo HCV (Figura 13). O IFN- $\alpha$ , assim como várias outras citocinas e quimiocinas antivirais, são capazes de inibir a replicação viral e promovem a subsequente resposta imune adaptativa. O IFN- $\beta$  é induzido diretamente a partir do reconhecimento do patógeno (STUART *et al.*, 2013) e o IFN- $\gamma$  é produzido pelas células NK e NKT como parte da resposta imune inata (HEIM & THIMME, 2014).

As células NK podem desempenhar um papel importante no controle da infecção pelo HCV. As células NK e NKT são abundantes no fígado e participam das respostas imunes primárias que ocorrem em resposta à produção de IFN- $\gamma$  e outras citocinas. No entanto, a ligação da proteína viral E2 ao receptor CD81 promove a inibição da atividade das células NK (STUART *et al.*, 2013). As NK estão em maior quantidade no fígado humano em comparação com o sangue periférico. Esse quadro se intensifica na infecção crônica pelo HCV (HEIM & THIMME, 2014).

Thimme e colaboradores (2012) descrevem um modelo de como o sistema imune inato responde frente à presença do HCV. Após a entrada do vírus na célula, o RNA é traduzido e inicia-se a produção das proteínas virais de forma massiva, tais como NS5A, NS3/4A. A partir da replicação de genomas de RNA viral no citoplasma, observa-se a formação de intermediários de RNA fita dupla (dsRNA). As proteínas e genoma virais podem ser empacotados em novas unidades virais ou podem reiniciar o ciclo de replicação. O RNA viral que apresenta fita dupla é detectado pelo sistema imune inato por meio de receptores de padrão de reconhecimento (PRRs), como PKR, RIG-I ou receptores endossomais do tipo *Toll-like* (TLR3). RIG-I se liga à molécula adaptadora MAVS (do inglês *mitochondrial antiviral-signaling protein*), iniciando uma cascata de sinalização que leva à fosforização e acumulação de IRF3 no núcleo. O IRF3 promove a transcrição dos genes que codificam para IFNs tipos I e III, assim como para diversos genes estimulados por interferon (ISGs). O IFN produzido nessa resposta primária se liga às células infectadas de forma autócrina e parácrina, e desencadeia a via JAK/STAT (do inglês *Janus kinase/signal transducers and activators of Transcription*) pela ativação das quinases da família Janus. STAT1 (do inglês *Signal transducer and activator of transcription 1*) e STAT2 (do inglês *Signal Transducer And Activator Of Transcription 2*) são fosforiladas e promovem heterodimerização e associação com IRF9. Esse complexo trimérico, conhecido como ISGF3, pode adentrar no núcleo e estimular a transcrição dos ISGs. Já no citoplasma, mRNAs para ISGs são traduzidos para produzir as proteínas com ação antiviral (THIMME *et al.*, 2012). Além disso, o HCV pode bloquear esse mecanismo inato em diversas etapas, como pelo bloqueio parcial da sinalização JAK/STAT visto em diferentes linhagens celulares e em camundongos transgênicos que expressam proteínas do HCV (HEIM *et al.*, 1999; BLINDENBACHER *et al.*, 2003; BODE *et al.*, 2003; LUQUIN *et al.*, 2007).

### ***1.12.2 Resposta imune adaptativa frente ao HCV***

As respostas imunes adaptativas se tornam detectáveis em aproximadamente 6 a 8 semanas após a exposição ao patógeno, diferente da resposta imune inata que é induzida a partir de horas após o contato (KLENERMAN & THIMME, 2012). A resposta imune adaptativa é direcionada contra o patógeno e é capaz de promover a resposta de memória de longo prazo, através da imunidade humoral. Os linfócitos B são responsáveis pela produção de anticorpos que podem fornecer proteção contra a reinfecção. Além disso, as células T CD4<sup>+</sup> contribuem para a imunidade humoral, ao ativar as células B (CHANG, 2003).

As respostas por células T estão associadas ao desfecho da infecção aguda pelo HCV. Na hepatite C aguda com resolução da infecção, há uma resposta intensa que está associada à presença das células T  $CD4^+$  (*helper*) e  $CD8^+$   $IFN\gamma^+$  (citotóxica) no sangue periférico. Quando essa resposta é fraca, localizada ou transitória, há a persistência viral (KAPLAN, 2015). As células T-1 produzem citocinas antivirais, como  $IFN-\gamma$  e IL-12, e inflamatórias, como  $TNF-\alpha$  e IL-1. Já os linfócitos T *helper*-2 (Th2) produzem IL-4 ou IL-10, suprimindo a resposta Th1, pois promovem a inibição da secreção de  $IFN-\gamma$  e de IL-12. As células T proliferam rapidamente durante a infecção aguda e podem ser detectáveis por anos no sangue e no fígado em indivíduos com *clearance* viral (STUART et al., 2013).

Os linfócitos T-*helper* ( $CD4^+$ ) e T-citotóxicos ( $CD8^+$ ) participam da patogênese e evolução da doença. Eles podem eliminar as células infectadas diretamente ou de forma indireta ao produzir fatores como citocinas e quimiocinas que contribuem para o processo inflamatório e/ou inibição da replicação viral. Esses fatores desempenham um papel fundamental na patogênese e evolução da doença (*clearance* vs. persistência) em pacientes com HCV. Diversos componentes do sistema imunológico adaptativo estão envolvidos no *clearance* viral, incluindo a resposta de anticorpos neutralizantes que evitam a entrada do vírus em novas células e as respostas desencadeadas pelas células T. Foi mostrado que indivíduos com infecção crônica podem apresentar uma produção deficiente desses anticorpos neutralizantes (PESTKA et al., 2007), mas o controle e a eliminação do vírus também podem ser observados na ausência desses anticorpos (KLENERMAN & THIMME, 2012).

Na Figura 13 é possível observar as respostas imunes, inata e adaptativa, contra o vírus HCV desempenhadas por diversos tipos de células. Células dendríticas residentes, células estreladas hepáticas e células de Kupffer podem produzir citocinas como CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), IL-12, IL-15 e IL-18 para recrutar as células NK produtoras de  $IFN-\gamma$ . As quimiocinas CXCL9 e CXCL10 são importantes para atrair as células T ao foco da infecção (KAPLAN, 2015). Na resposta imune adaptativa, (a) as células dendríticas de memória (mDC) ativam células  $CD8^+$ , células  $CD4^+$  e células natural killer (NK) pela liberação de citocinas como IL-15, IL-4 e IL-12. (b) As células NK produzem  $IFN-\gamma$  para mediar efeitos antivirais. (c) As células  $CD8^+$  e  $CD4^+$  controlam a diferenciação das células Th1 e Th2, as quais regulam a funcionalidade dos macrófagos e induzem células T citotóxicas (CTL) e T regulatórias (Treg). (d) O receptor CD81 nas células NK pode ser bloqueado pela proteína E2 do HCV, reduzindo assim a liberação de  $IFN-\gamma$ , e moléculas citotóxicas por essas células. (e) A expressão de MHC-I é aumentada nos hepatócitos afetados, pela proteína do core de HCV, assim reduzindo a atividade das células NK contra as



por moléculas de MHC-I na superfície celular, indução da produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e desencadeamento de mecanismos citolíticos para morte da célula infectada (OBAID *et al.*,2018).

A falha de diferentes mecanismos na resposta imune adaptativa pode levar à infecção persistente/crônica e evolução da patologia. Por exemplo, por incapacidade das células T de migrarem para o local da infecção ou por apresentação antigênica reduzida devido à inibição de receptores. Foi observado que células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> obtidas de pacientes com hepatite C crônica, após estimulação antigênica *ex vivo*, exibiam anomalias de maturação, com uma diminuição da capacidade citotóxica, menor secreção de citocinas do tipo Th1, bem como com um potencial proliferativo mínimo (REHERMANN, 2009).

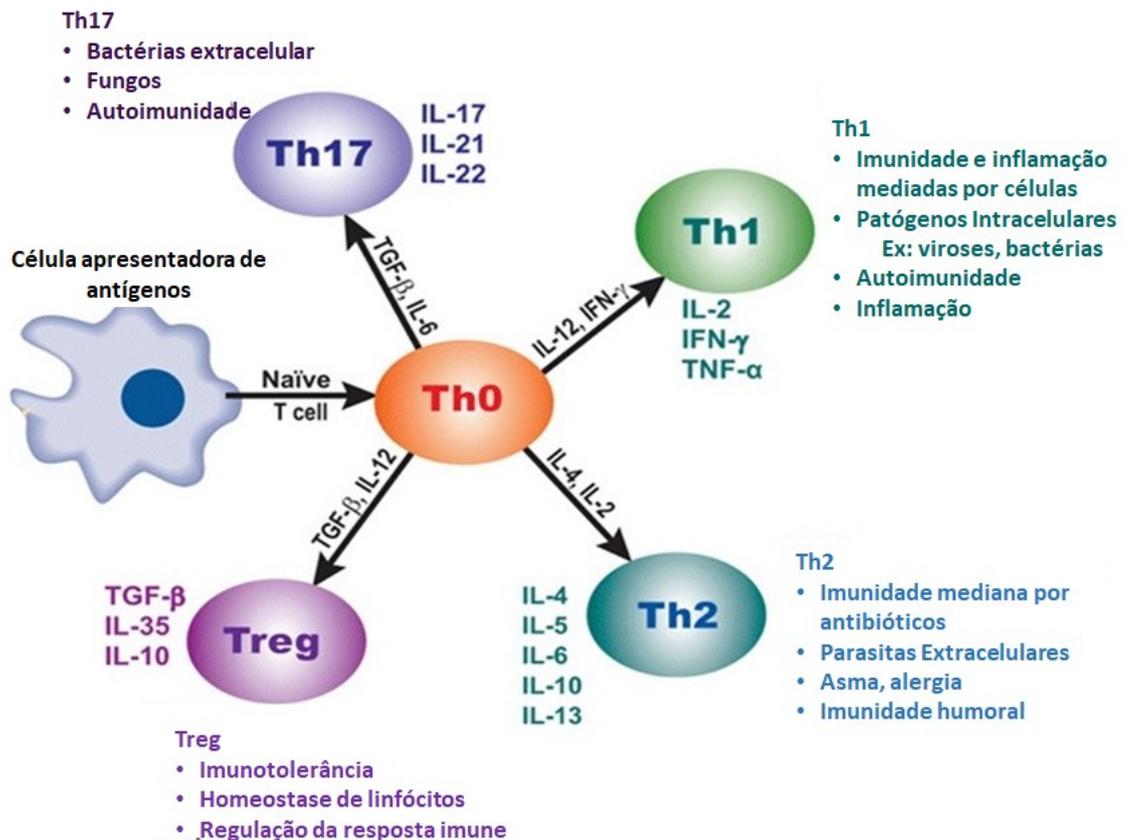
### **1.13 Citocinas e quimiocinas como biomarcadores da resposta imune**

A resposta imune é crucial no controle das infecções e das doenças crônicas, sendo que citocinas e quimiocinas são fundamentais nesse processo. Existem diversas vias de sinalização que são controladas por citocinas, tais como crescimento e diferenciação celular e apoptose. Portanto, as citocinas são mediadores críticos da comunicação para o sistema imunológico e são essenciais para a defesa do hospedeiro contra patógenos (ANTONELLI *et al.*,2018).

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular que estimulam a inflamação, o desenvolvimento/reparo de tecidos e a hematopoiese. Elas são produzidas por diversas células imunes, como macrófagos, linfócitos B e T, além de fibroblastos e células epiteliais (fígado, tireoide, pâncreas, pulmão, intestino) (HEYDTMANN & ADAMS, 2010). Elas podem atuar nas células-alvo de três formas: autócrina, parácrina e/ou endócrina, promovendo a indução de respostas locais e sistêmicas. Também possuem atividade pleiotrópica, com capacidade de afetar de forma aditiva, sinérgica e antagônica outras citocinas (CARSON & KUNKEL, 2017).

Já foram descritas mais de 100 citocinas que podem ser classificadas de acordo com suas funções. As citocinas pró-inflamatórias, como TNF ( $\alpha$  e  $\beta$ ) e IFN- $\gamma$ , aumentam a resposta imune celular, produzida por linfócitos Th1 ativados. Entre as principais funções desse tipo de citocinas estão o crescimento e a diferenciação de leucócitos precursores, além de serem moduladores e iniciadores da resposta inflamatória (CARSON & KUNKEL, 2017). As citocinas do tipo Th2, como IL-4, IL-5, IL-13, favorecem as respostas de anticorpos, com a proliferação de células B e produção de anticorpos. As citocinas Th17, como IL-23, IL-6 e

TGF- $\beta$ , são importantes para a diferenciação de linfócitos Th0 em Th17, que secretam IL-17A, IL-17F, TNF- $\alpha$  e IL-1, promovendo uma reação pró-inflamatória (HEYDTMANN& ADAMS, 2010) (Figura 14).



**Figura 14: As citocinas e suas funções na diferenciação das respostas Th.** As respostas podem ser caracterizadas como do tipo Th1, (importante na imunidade contra patógenos intracelulares, como os vírus), Th2 (importantes na imunidade humoral, como na formação dos inibidores), Treg (importante para a imunotolerância pela inibição das respostas Th1 e Th2), além da resposta Th17, que é mais comum na autoimunidade (pró-inflamatória). Fonte: Adaptada de PETERSON, 2018.

As quimiocinas são consideradas citocinas quimiotáticas, pois são capazes de induzir quimiotaxia em células próximas (migração de leucócitos), além de serem pequenas com aproximadamente 8 a 10 kDa. Elas podem ser classificadas em quatro subfamílias: CXC ( $\alpha$ ), CC ( $\beta$ ), C ( $\gamma$ ) e CX3C ( $\delta$ ) e seus receptores são CXCR, CCR, CR e CX3CR, respectivamente. As principais funções das quimiocinas são homeostáticas ou pró-inflamatórias. As quimiocinas homeostáticas estão envolvidas no tráfego e localização de linfócitos no sistema linfático, como por exemplo, CXCL13, CCL21 e CCL19. Já as quimiocinas pró-inflamatórias são produzidas

durante infecções e induzem a migração de leucócitos para o local infectado, além de ativar as células para intensificar a resposta imune, como por exemplo, CXCL8, CCL5, CCL11, CCL4, CCL2 e CXCL10 (ANTONELLI *et al.*,2008)

Na Tabela 2 são descritas as principais fontes, células-alvo e funções das citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, INF- $\gamma$  e IL-17A) e quimiocinas (CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG, e CXCL10/IP-10) que foram analisadas no presente estudo.

**Tabela 2: Descrição das principais funções das citocinas e quimiocinas.**

Células	Principais fontes	Principais alvos celulares	Principais funções
<b>Eixo Th1 - Pró-inflamatória</b>			
TNF $\alpha$	Macrófagos (APC), neutrófilos, linfócitos, NK, endotélio e mastócitos	Macrófagos	Tem amplo espectro de ação, incluindo proliferação celular, diferenciação, apoptose, metabolismo de lipídio e coagulação. Promove ativação de célula fagocítica, e choque endotóxico. Interage com células endoteliais para induzir moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina e permitir a entrada de granulócitos no foco inflamatório. É um potente ativador de neutrófilos, mediando aderência, quimiotaxia, degranulação e a explosão respiratória.
TNF $\beta$	Monócitos, Células T	Células tumorais, fagócitos	Promove citotoxicidade de tumor, quimiotaxia, fagocitose, tem ação oncostática, e pode induzir a produção de outras citocinas.
IFN- $\gamma$	Células T, Células B, NK e Fagócitos	Várias	Envolvido nas respostas imunes a patógenos intracelulares. Tem atividade antiviral e imunorregulatória. Tem um papel chave na defesa contra patógenos por promover o desenvolvimento e ativação de células Th1, quimio- atração e ativação de monócitos, macrófagos e NK, estimulação da expressão de MHC classe I e II e da apresentação de antígeno e produção de citocina por APC. Estimula o desvio de classe de imunoglobulinas nas células B. Tem efeitos antiproliferativos e apoptóticos. Pode potencializar os efeitos antiviral e antitumoral dos interferons tipo I. Aumenta função de neutrófilo. Capaz de suprimir muitos efeitos mediados por IL-4.
CXCL9	Monócitos, células endoteliais, fibroblastos em resposta ao IFN- $\gamma$	Células T	Quimiotática para células T ativadas, mas não para neutrófilos. Afeta o crescimento, movimento ou estado de ativação das células que participam da resposta imune e inflamatória.
CXCL10	monócitos, células endoteliais, fibroblastos em resposta ao IFN- $\gamma$	Células T, monócitos e células NK	Quimiotática para linfócitos Th1 e monócitos. Causa efeitos pleiotrópicos, incluindo a estimulação de monócitos, migração de células T e NK, e modulação da expressão de moléculas de adesão. Envolvida na quimiotaxia, diferenciação, e ativação de células imune periféricas, regulação do crescimento celular, apoptose e modulação de efeitos angiostáticos.
<b>Eixo Th2</b>			
IL-4	Células Th ativadas	Células B, T, macrófagos	Participa de vários processos de ativação de células B e outros tipos celulares. Induz diferenciação Th2. Proliferação de células B e T citotóxicas, potência expressão de MHC classe II, estimula produção de IgG e IgE. Estimula autofagia em células dendríticas.

Continuação da tabela 2

Células	Principais fontes	Principais alvos celulares	Principais funções
<b>Células Th17 - Pró-inflamatória</b>			
IL-6	Macrófagos (APC)	Células B ativadas, plasmócitos	Atua na inflamação e maturação de células B. Diferenciação de linfócitos B em plasmócitos maduros e secreção de IgG. Media ativação de células T, crescimento e diferenciação. Tem um papel primário no desvio da resposta imune para Th17, sendo requerida para a geração de células Th17.
CXCL8	Neutrófilos	Neutrófilos, linfócitos	Principal mediador da resposta inflamatória. Recrutamento e ativação de neutrófilos, linfócitos e basófilos. Potente fator angiogênico.
IL-17A	Células Th CD4+	Células estromais	Envolvida na resposta imune a patógenos extracelulares. Induz a expressão de várias citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias por células estromais, fibroblastos, do endotélio e epitélio, incluindo IL-6, CXCL8, CXCL10, citocinas importantes para ambas ativações de fibroblastos e recrutamento de neutrófilos.
<b>Treg - Anti-inflamatória</b>			
IL-10	Células T, B e monócitos	Células B, macrófagos	Possui importante função imunorregulatória anti-inflamatória, inibindo a produção de citocinas: IFN- $\gamma$ pelos linfócitos Th1; IL-4 e IL-5 pelos linfócitos Th2; IL-1b, IL-6, CXCL8, IL-12 e TNF- $\alpha$ pelos fagócitos mononucleares; IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ pelas células NK. Inibe expressão de MHC classe II, e moléculas coestimulatórias em macrófagos. Assim, inibe a expansão e ativação de células Th1 e Th17, promovendo o desenvolvimento de macrófagos M2 e células Treg. Pode também potenciar a sobrevivência dos linfócitos B, proliferação e produção de anticorpo.
<b>Amplo espectro</b>			
IL-2	Células T estimuladas	Células T e B ativadas, células NK	Importante para a proliferação clonal e ativação específica a antígenos de linfócitos T. Atua no desenvolvimento, manutenção e função de células T regulatórias (Treg) e diferenciação de células T em células efetoras e de memória. Pode estimular células B, monócitos, NK e macrófagos.
CCL2	Vários tipos celulares, os principais sendo leucócitos mononucleares	Monócitos, linfócitos e basófilos	Atividade quimiotática sobre monócitos e basófilos, mas não para neutrófilos ou eosinófilos. Aumenta atividade anti-tumor de monócitos. Pode inibir produção de IL12 das células APC e potenciar produção de IL-4 de células T ativadas, levando ao fenótipo Th2.
CCL5	Vários tipos celulares, incluindo macrófagos, DC, linfócitos e células endoteliais	Células Th de memória, monócitos, basófilos	Quimiotaxia para monócitos, células T-helper de memória e eosinófilos. Pode promover diretamente o desenvolvimento de células Th1 produzindo IFN $\gamma$ ou indiretamente por aumentar a produção de IL12 pelas células APC.

## 2 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que o desenvolvimento de inibidores, anticorpos neutralizantes contra o FVIII, é hoje o principal desafio no tratamento dos pacientes com hemofilia A, uma vez que o risco de transmissão de doenças pela transfusão de hemoderivados foi drasticamente reduzido com a utilização dos testes de triagem no doador de sangue e pelo uso de FVIII recombinante a partir dos anos 90. No entanto, antes desse período, os pacientes foram submetidos a uma série de transfusões de hemoderivados para a reposição do FVIII, e a taxa de infecção pelo HCV ainda é elevada nessa população, especialmente nos pacientes mais velhos. O tratamento da hemofilia A e da infecção pelo HCV são diversos, dependendo das características clínicas e da resposta apresentada pelos pacientes, e conhecer melhor as características da resposta imune relacionadas à hemofilia A e à infecção pelo HCV pode contribuir para superar os desafios apresentados no manejo clínico dos pacientes, especialmente quando apresentam simultaneamente essas duas condições.

O desenvolvimento de inibidores é um grande empecilho no tratamento do paciente com hemofilia, e é preciso destacar que ainda existem várias lacunas no conhecimento sobre os mecanismos que levam ao seu desenvolvimento. A formação de aloanticorpos anti-FVIII é resultado de uma resposta imunológica do paciente frente ao uso do FVIII terapêutico, e vários fatores de risco podem estar associados a esta resposta. Como a infecção pelo HCV também desencadeia uma série de respostas imunes no hospedeiro, a exposição ao vírus pode ter um potencial de alterar o curso clínico da hemofilia, incluindo a resposta de desenvolvimento de inibidor. A proposta desse estudo foi investigar se a exposição atual ou passada ao HCV influencia na ocorrência de inibidor, e se marcadores de resposta inflamatória, como citocinas e quimiocinas, podem ser associados a essa resposta.

A interação entre a hemofilia A e hepatite C, que podem se manter por toda a vida do indivíduo, é pouco conhecida, e entender como uma condição afeta o curso da outra pode ser importante no cuidado do paciente. Neste trabalho, nós avaliamos a influência da exposição ao HCV na ocorrência de inibidores e sua associação com biomarcadores da resposta imune em uma coorte de pacientes com hemofilia A acompanhada por 30 anos pelo Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação Hemominas.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a influência da exposição ao HCV na ocorrência de inibidores em pacientes com hemofilia A acompanhados pelo Hemocentro de Belo Horizonte, Minas Gerais, e a associação de biomarcadores com a história de infecção pelo HCV e de formação de inibidor.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Descrever e comparar as características clínicas e de tratamento da hemofilia A segundo a exposição ao HCV na coorte de pacientes;
- Descrever as características clínicas da infecção pelo HCV e de seu tratamento nos pacientes com hemofilia A;
- Quantificar as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, INF- $\gamma$ , IL-17A e as quimiocinas CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 em plasma de pacientes com hemofilia A segundo a exposição ao HCV e a ocorrência de inibidor do fator VIII;
- Caracterizar as respostas imune anti-HCV e de formação de anticorpos anti-FVIII pelos níveis plasmáticos das citocinas e quimiocinas analisadas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 População de estudo

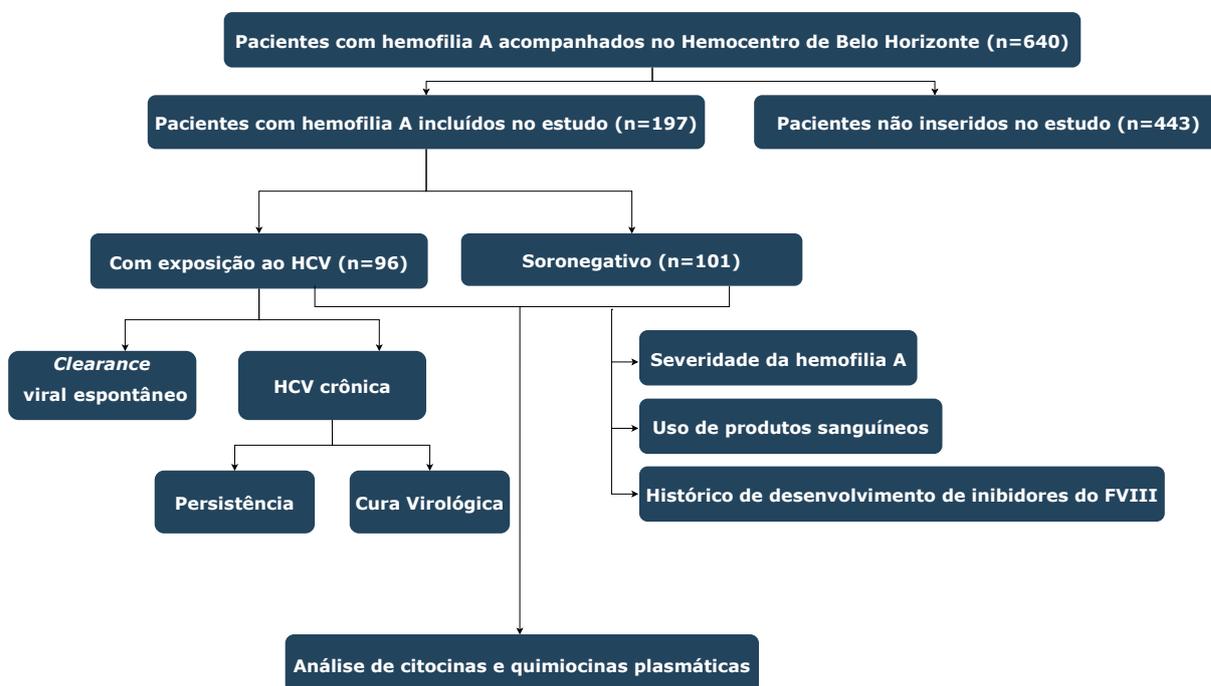
O presente estudo pode ser classificado como observacional, analítico e transversal. Os pacientes incluídos faziam parte de uma coorte de 771 pacientes masculinos portadores de hemofilia A e B, sendo 640 portadores da hemofilia A e 131 portadores de hemofilia B, com registro de acompanhamento pelo Hemocentro de Belo Horizonte, Fundação Hemominas, no período de janeiro de 1985 a janeiro de 2015. Desde 1985, o Hemocentro de Belo Horizonte tem sido o responsável pelos cuidados de pacientes com hemofilia em Belo Horizonte e região metropolitana, sendo um dos maiores centros de referência de tratamento de pacientes com hemofilia no Brasil.

A partir dessa coorte, foram selecionados para o presente estudo apenas pacientes com hemofilia A (n=640), sendo que destes 259 apresentavam pelo menos um teste reativo para anti-HCV durante o período de estudo, indicando exposição ao vírus. Em uma amostra de conveniência foram selecionados 101 pacientes com exposição ao HCV (presença de anticorpos anti-HCV) que possuíam amostra de plasma previamente coletada. Já o grupo de comparação, 96 pacientes sem exposição (soronegativos) a este vírus e outras infecções transmissíveis por transfusão (HIV, HBV, HTLV, *Trypanosoma cruzi* e *Treponema pallidum*) foram selecionados de forma randomizada e pareados de acordo com a idade (

Figura 15).

Estes dois grupos foram avaliados quanto aos aspectos clínicos da hemofilia A, como a severidade da hemofilia, uso de produtos sanguíneos e especialmente quanto ao desenvolvimento de anticorpos inibidores do FVIII (INB), sendo classificados em: sem histórico de desenvolvimento de inibidor (INB<sup>-</sup>) e com histórico de desenvolvimento de inibidor (INB<sup>+</sup>). Os grupos também foram classificados em relação à exposição ao HCV, sendo: soronegativos (SN): sem exposição ao HCV e outras infecções transmissíveis por transfusão; com *clearance* espontâneo ou por tratamento da infecção pelo HCV (*cl*-HCV); e com infecção

crônica pelo HCV (HCV). Essa classificação também foi utilizada para a análise de biomarcadores de resposta imunológica.



**Figura 15: População de pacientes com hemofilia A incluída no estudo de biomarcadores de resposta imunológica.** Os pacientes, com registro de acompanhamento pelo Hemocentro de Belo Horizonte, Fundação Hemominas, no período de janeiro de 1985 a janeiro de 2015, foram classificados pela análise de prontuário médico em dois grupos: com exposição ao HCV (presença de anticorpos anti-HCV) e soronegativo (ausência de marcadores para HCV, HIV, HBV, HTLV, *Trypanosoma cruzi* e *Treponema pallidum*).

Esse estudo é um subprojeto do estudo aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Fundação Hemominas intitulado “Estudo do desfecho da infecção pelo HCV em pacientes com hemoglobinopatias e coagulopatias e avaliação do impacto do tratamento da infecção sobre a doença genética de base” (Número do parecer: 2.630.250) (CAAE: 17781113.0.0000.5118) (Anexo 1). Todos os pacientes inseridos no estudo assinaram o TCLE (Anexo 2) autorizando o acesso aos prontuários médicos e a coleta de amostras. As amostras de plasma utilizadas no experimento foram coletadas entre junho de 2015 a agosto de 2018.

## 4.2 Variáveis analisadas

Os dados clínicos e laboratoriais da coorte de pacientes com hemofilia atendidos no HBH, entre janeiro de 1985 a janeiro de 2015, foram coletados dos prontuários médicos, físicos e eletrônicos, e posteriormente transcritos para banco digitalizado. As variáveis foram subdivididas em seções, entre elas, dados gerais, sócio demográficos, diagnóstico da coagulopatia, história transfusional, diagnóstico da infecção pelo HCV e demais resultados sorológicos, características epidemiológicas, aspectos clínicos da hepatite C e tratamento, além das comorbidades, e marcadores de resposta ao tratamento. O questionário encontra-se disponível no Anexo 3. As variáveis “uso de profilaxia” e “tratamento de imunotolerância” foram inseridas no banco de dados, após consulta dos prontuários médicos. Já as variáveis “presença de viremia atual (HCV-NAT)” e “biomarcadores” foram originadas a partir de experimentos desenvolvidos neste estudo.

Na caracterização dos grupos de estudo, foram consideradas as seguintes variáveis, coletadas dos prontuários médicos:

1) Idade na coleta da amostra.

### *Variáveis relacionadas à hemofilia*

2) Uso de hemocomponentes/hemoderivados: registro de uso de crioprecipitado, plasma fresco congelado e/ou FVIII hemoderivado.

3) Gravidade da hemofilia: classificada de acordo com o nível de FVIII, sendo grave quando o nível é inferior a 1% (ou  $<0,01$  UI/mL), moderada quando o nível está entre 1% a 5% (ou 0,01 a 0,05 UI/mL), e leve se o nível é de 5% a 40% (ou  $>0,05$  a 0,40 UI/mL).

4) Desenvolvimento de inibidor: pelo menos um registro de presença de anticorpos anti-FVIII no prontuário médico. Inibidores do FVIII são anticorpos da classe IgG direcionados contra o fator VIII infundido no paciente.

5) Nível de inibidor (Unidade de Bethesda, BU): *baixo* ( $<5$  BU/mL); *alto* ( $\geq 5$  BU/mL). O nível de inibidor foi considerado como baixo ou alto levando-se em conta o maior valor registrado no prontuário médico do paciente.

6) Uso de profilaxia: tratamento profilático de reposição do FVIII. O tratamento profilático se subdivide em três modalidades: (1) profilaxia primária - refere-se ao tratamento de reposição

administrado de maneira periódica e ininterrupta, iniciado na ausência de doença articular e antes da ocorrência da segunda hemartrose e dos 3 anos de idade, por período superior a 45 semanas por ano; (2) profilaxia secundária - pode ser de longo prazo, quando a reposição é feita de maneira periódica e ininterrupta por longo prazo (> 45 semanas por ano), iniciada após duas hemartroses e na ausência de doença articular, ou de curto prazo (ou intermitente), quando a reposição é administrada de maneira intermitente por tempo determinado por menos de 45 semanas por ano, em geral para tratamento de sangramentos frequentes e (3) profilaxia terciária, que se refere ao tratamento de reposição administrado de maneira periódica e ininterrupta (>45 semanas por ano) iniciado após a instalação de doença articular (Brasil, 2014).

7) Tratamento de imunotolerância: consiste na infusão diária ou em dias alternados do concentrado de FVIII, na tentativa de dessensibilizar o paciente, sendo, portanto, realizado apenas em pacientes com hemofilia e inibidor. O tratamento pode durar de semanas a anos, podendo ser de baixas ou altas doses (Brasil, 2015).

8) Comorbidades: presença de outras condições clínicas.

#### *Variáveis relacionadas à infecção pelo HCV*

9) Exposição ao HCV: contato prévio com o HCV, levando-se em consideração o *status* sorológico anti-HCV, registrado no prontuário médico. Teste anti-HCV positivo: exposto ao HCV; Teste anti-HCV negativo: não exposto ao HCV (sem contato prévio com o vírus).

10) Genótipo do HCV: registro no prontuário médico do genótipo do HCV.

11) *Status* da infecção: *clearance* viral espontâneo (pacientes sem detecção de RNA do HCV antes do tratamento); HCV crônica (paciente sem *clearance* viral espontâneo).

12) Condição clínica na infecção crônica: assintomático; com sinais de alteração hepática (pacientes com registro nos prontuários de exame de ultrassom indicando características de fibrose hepática, hipertensão portal e/ou nódulo hepático, além de biopsia hepática e registro de cirrose hepática).

13) Indicação de tratamento para HCV: registro no prontuário médico de recomendação médica para realizar ou não o tratamento para HCV.

14) Realização do tratamento para HCV: para os pacientes com recomendação médica de realizar o tratamento para HCV, verificação no prontuário médico se o tratamento foi realmente realizado, e se sim, se ele foi completo ou incompleto.

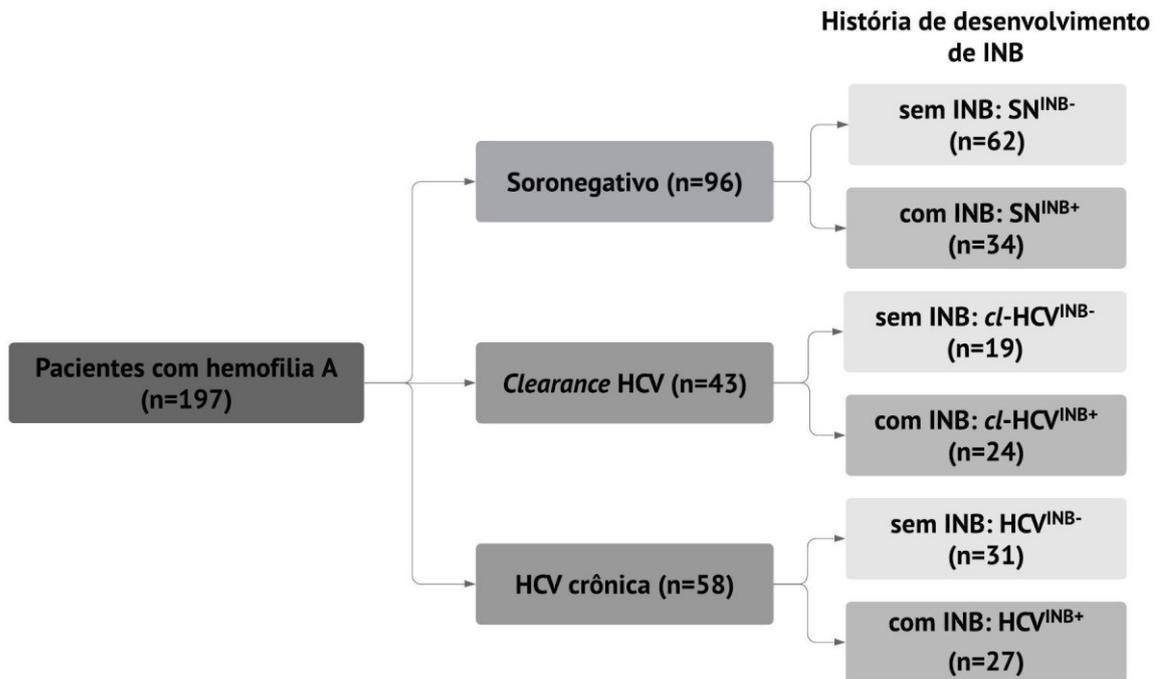
15) Tipo de tratamento para HCV: para os pacientes que realizaram o tratamento para HCV, verificação no prontuário médico de qual regime terapêutico foi usado.

16) Resultado final do tratamento para HCV: para os pacientes que realizaram o tratamento para HCV, verificação no prontuário médico se o paciente teve uma resposta virológica sustentada (RVS), uma resposta virológica com recidiva ou foi não respondedor pleno.

17) Presença de viremia atual: para os pacientes com HCV crônica, que não trataram para HCV ou que trataram, mas não tiveram resposta virológica sustentada, foi feito o teste para detecção de RNA do HCV. Foi usada uma alíquota da mesma amostra de plasma que foi utilizada para a quantificação dos biomarcadores imunológicos. O teste foi feito pelo Laboratório NAT da Fundação Hemominas, utilizando-se o Kit NAT-HIV/HCV/HBV de Bio-Manguinhos/Fiocruz, técnica nacional que permite a detecção dos vírus HIV e HCV numa reação e do HBV numa outra reação através da plataforma de PCR em tempo real. A partir do resultado do teste NAT para detecção qualitativa de RNA de HCV, os pacientes foram considerados como tendo viremia atual (presença de RNA de HCV) ou sem viremia atual (RNA do HCV não detectado no plasma).

#### **4.3 Quantificação de citocinas e quimiocinas no plasma de pacientes com hemofilia A usando citometria de fluxo**

A fim de investigar se a infecção pelo HCV influencia na formação do inibidor de FVIII e se essa influência tem relação com a imunomodulação de citocinas e quimiocinas, foi avaliado o nível desses biomarcadores de resposta imune nos pacientes com hemofilia A sem registro de infecção pelo HCV e com exposição ao HCV, sendo este último grupo subclassificado em *clearance* de HCV (com cura espontânea e com resposta virológica sustentada ao tratamento da infecção) e com HCV crônica (Figura 16). Além disso, os pacientes foram subdivididos de acordo com o registro de ter ou não desenvolvido inibidor para o fator VIII.



**Figura 16: Pacientes selecionados para a quantificação de biomarcadores imunológicos.** Seleção e classificação dos pacientes, em subgrupos, para investigar se a infecção pelo HCV influencia na formação do inibidor de FVIII (INB) e se essa influência tem relação com a imunomodulação de citocinas e quimiocinas. INB+: com registro de desenvolvimento de INB; INB-: sem registro de desenvolvimento de INB. Pacientes com *clearance* de HCV incluíram os com cura espontânea e os com resposta virológica sustentada ao tratamento.

A quantificação das citocinas e quimiocinas plasmáticas nas amostras de plasma dos pacientes foi realizada utilizando-se os kits comerciais Th1/Th2/Th17 citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-17A) e quimiocinas (CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1 e CXCL10/IP-10) (CBA - Cytometric Bead Array – Bencton, Dickinson and Company - BD/Pharmingen) para citometria de fluxo.

Resumidamente, para o protocolo de quantificação das citocinas e quimiocinas, as amostras dos pacientes que estavam armazenadas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  foram inicialmente descongeladas em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  e centrifugadas a  $12.000 \times g$  por 10 minutos para a utilização do sobrenadante. Foi feita a preparação da curva padrão pela diluição seriada do padrão fornecido no kit com o diluente G (Diluente do ensaio). Em seguida, foi preparado o *pool* das *beads* (A1 a A7) para a detecção das citocinas, ou o *pool* das *beads* (A1 a A5) para a detecção das quimiocinas. Cada teste foi feito em tubo de poliestireno de 5 mL (12x75mm) contendo 15  $\mu\text{L}$  da mistura de *beads*, 25  $\mu\text{L}$  da amostra de plasma, e 18  $\mu\text{L}$  do reagente B (Reagente de detecção: anticorpos monoclonais contra os analitos específicos conjugados com o fluorocromo). O período de incubação foi de 3 horas, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após incubação, em cada tubo foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  do Reagente F (Tampão de lavagem), seguida de

centrifugação a 600 x g por 7 minutos a 18°C. Duzentos microlitros do sobrenadante foram cuidadosamente aspirados e descartados, deixando-se aproximadamente 100 µL do sobrenadante em cada tubo. Por fim, adicionaram-se 100 µL do Reagente F (Tampão de lavagem) em cada tubo em local protegido da luz e foi realizado a leitura no citômetro BD Accuri™ C6 Plus. As amostras foram dosadas uma única vez. Após a leitura das amostras, os dados foram analisados no programa FCAP-array™ (v 3.01) e a concentração das citocinas e quimiocinas foi apresentada em pg/mL. Para cada conjunto de amostras testadas simultaneamente foram incluídos no ensaio um tubo controle negativo (sem amostra, contendo apenas o diluente G) e a curva padrão.

#### **4.4 Análises Estatísticas**

Os testes de qui-quadrado ou teste exato de Fisher foram usados para testar a associação de variáveis nominais. Variáveis contínuas foram inicialmente avaliadas pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para definir se os dados eram paramétricos ou não-paramétricos. As variáveis paramétricas ou não-paramétricas foram comparadas pelo teste t ou teste de Mann-Whitney, respectivamente. Análises de correlação entre cada citocina e quimiocina foram feitas usando o teste de correlação de Spearman, uma vez que os dados eram não paramétricos. A interpretação dos resultados de correlação foi: bem fraca, de 0,00 a 0,19; fraca, de 0,20 a 0,39; moderada, de 0,40 a 0,69; forte, de 0,70 a 0,89; muito forte, de 0,90 a 1,00. Foi considerada significativa a probabilidade de erro alfa  $p < 0,05$ . Análise multivariada dos dados (concentração das citocinas e quimiocinas, exposição ao HCV, gravidade da hemofilia, desenvolvimento e nível de inibidor) para avaliação de agrupamentos foi realizada usando-se análise de componente principal (PCA) e Heatmap, com o uso da ferramenta virtual ClustVis disponível *on line* (<http://biit.cs.ut.ee/clustvis>) (METSALU; VILO, 2015).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 História clínica e de tratamento da hemofilia A

A fim de verificar se a infecção pelo HCV tem influência nas características clínicas da hemofilia A, foi comparada a história clínica e de tratamento da hemofilia dos pacientes sem ou com registro de reatividade para HCV (Tabela 3). A média da idade dos pacientes soronegativos foi de 20,7 anos e foi menor que a média dos pacientes HCV reativo (42,4 anos), sendo essa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 3: Características clínicas e de tratamento de pacientes com hemofilia A segundo exposição ao HCV, entre os anos de 1985 a 2018 na Fundação Hemominas, Belo Horizonte, MG.**

Características	Soronegativo <sup>b</sup> (n=96)	HCV reativo <sup>a</sup> (n=101)	P <sup>c</sup>	OR (95% CI)
Média idade (variação)	20,7 (3,0-54,4)	42,4 (27,6-67,8)	<0,001 <sup>d</sup>	...
Uso de crioprecipitado	25/84 (29,8%)	99/100 (99,0%)	<0,001	233,6 (30,84-1770)
Uso de plasma fresco congelado	10/79 (12,7%)	64/93 (68,8%)	<0,001	15,23 (6,87-33,73)
Uso exclusivo de hemoderivado	55/88 (62,5%)	0/101 (0%)	<0,001	0,003 (0,0002-0,05)
Gravidade da hemofilia				
<i>Leve</i>	5/96 (5,2%)	2/101 (2,0%)	<0,001*	3,98 (2,19-7,24)
<i>Moderada</i>	53/96 (55,2%)	26/101 (25,7%)		
<i>Grave</i>	38/96 (39,6%)	73/101 (72,3%)		
Com história de desenvolvimento de inibidor FVIII	34/96 (35,4%)	51/101 (50,5%)	0,044	1,86 (1,05-3,30)
Nível inibidor FVIII <sup>c</sup>				
<i>Baixo</i> (< 5 BU/mL) <sup>f</sup>	6/34 (17,6%)	40/51 (78,4%)	<0,001	16,97 (5,62-51,29)
<i>Alto</i> (≥ 5 BU/mL)	28/34 (82,4%)	11/51 (21,6%)		
Tratamento de profilaxia	57/101 (56,4%)	53/96 (55,2%)	0,887	1,05 (0,60-1,85)
Tratamento de imunotolerância	4/51 (7,8%)	5/34 (14,7%)	0,474	0,49 (0,12-1,99)
Comorbidades	11/96 (11,5%)	53/96 (55,2%)	<0,001	9,52 (4,52-20,08)

<sup>a</sup>Do grupo reativo para HCV: 64 (63,4%) indivíduos também foram reativos para outras infecções transmitidas pelo sangue: 59 HBV (2 HBsAg e anti-HBc e 57 anti-HBc), 10 HIV (EIA e WB), 4 HTLV (EIA e WB), 10 Sífilis (VDRL e/ou EIA) e 1 Doença de Chagas (EIA).

<sup>b</sup>Sem reatividade para: HCV (EIA), HBV (HBsAg e/ou anti-HBc), HIV (EIA e WB), HTLV (EIA e WB), Sífilis (VDRL e/ou EIA) e Doença de Chagas (EIA).

<sup>c</sup>Teste exato de Fisher, exceto <sup>d</sup>Teste Mann-Whitney.

\*Comparação entre grave vs. leve/moderado ( $p < 0,001$ ).

<sup>e</sup>Pico de inibidor

<sup>f</sup>BU: Unidade de Bethesda

No Brasil, pacientes que utilizavam produtos derivados de plasma, como o crioprecipitado e/ou plasma fresco congelado até o final da década de 1980 eram considerados pacientes de alto risco de transmissão transfusional do HCV, visto que só no início dos anos 90 tornou-se obrigatória a utilização de testes anti-HCV na triagem de doadores de sangue, através da Portaria do Ministério da Saúde nº 1.376 de 19 de novembro de 1993 (BRASIL, 1993). Por

exemplo, em Minas Gerais e na Bahia foi encontrada uma prevalência de 44,6% e de 42,2% da infecção pelo HCV em pacientes com hemofilia acompanhados nos hemocentros estaduais HEMOMINAS e HEMOBA, respectivamente (CARMO *et al.*,2002; SILVA *et al.*,2005).

Em nossa coorte, a utilização de crioprecipitado e de plasma fresco congelado foi predominante nos pacientes HCV reativo e mostrou ser associada com alto risco de exposição ao HCV (OR=233,6 e OR=15,23, respectivamente), enquanto que o uso exclusivo de hemoderivado foi maior nos pacientes soronegativos, sendo associado com proteção para a aquisição da infecção (OR=0,003) (Tabela 3). Um estudo recente desta mesma coorte mostrou que pacientes com hemofilia com menos de 30 anos possuem menor soroprevalência de anticorpos anti-HCV em comparação aos pacientes com mais de 30 anos (12,4% vs. 66,7%), pois os pacientes mais jovens utilizaram exclusivamente fatores de coagulação com inativação viral e assim tiveram menor risco de contrair a infecção pelo HCV por não utilizarem o plasma fresco congelado ou crioprecipitado (CARMO *et al.*,2019). Este último teve seu uso proibido no tratamento para hemofilia em 2002 (FERREIRA, 2014). Portanto, é fundamental a tomada de ações em saúde pública com medidas vinculadas à segurança transfusional para proporcionar uma redução da prevalência de HCV nessa população vulnerável (CARMO *et al.*,2002; SILVA *et al.*,2005, CARMO *et al.*,2019).

Em relação à gravidade da hemofilia A, uma maior frequência (55,2%) de pacientes soronegativos apresentam hemofilia moderada, diferente dos pacientes HCV reativo que têm principalmente hemofilia grave (72,3%). Comparando a frequência de pacientes com hemofilia grave vs. leve/moderada nos dois grupos, a diferença foi estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ , OR=3,98) (Tabela 3). A associação entre gravidade da hemofilia e exposição ao HCV pode ser explicada pelo fato de que pacientes graves apresentam mais eventos hemorrágicos e consequentemente, necessita de um número maior de infusões dos produtos sanguíneos, sendo assim, mais expostos aos hemocomponentes à época não triados, como crioprecipitado e plasma fresco congelado que foram as prováveis vias de transmissão do HCV (CARMO *et al.*,2019).

O desenvolvimento de inibidor foi mais frequente nos pacientes HCV reativo que nos pacientes soronegativos (50,5% vs. 35,4%) ( $p < 0,044$ ). Porém, embora esses pacientes tinham maior chance de desenvolver inibidor que aqueles sem sorologia positiva (OR=1,86), a grande maioria (78,4%) o apresentou em baixos níveis, ao contrário do que se observa no grupo de pacientes soronegativos, em que a maioria (82,4%) apresentou altos níveis de inibidor ( $p < 0,001$ , OR=16,97) (Tabela 3).

O risco de desenvolvimento de inibidor em pacientes com hemofilia está associado a diferentes fatores, incluindo a gravidade da doença, o número de vezes em que um paciente utiliza o concentrado de fator durante a vida, a intensidade das doses utilizadas para o tratamento, e o tipo de componente utilizado para reposição do fator (hemocomponente, fator purificado ou fator recombinante). Assim, a associação de história de desenvolvimento de inibidor com exposição ao HCV poderia ser resultado de uma associação espúria, visto que os pacientes HCV reativo são mais velhos e na sua maioria apresentam hemofilia grave, fatores estes associados com maior uso de hemocomponentes para reposição de FVIII. Porém, usando um modelo de regressão logística, foi mostrado por análise multivariada de 430 pacientes com hemofilia A desta mesma coorte que a infecção pelo HCV foi significativamente e independentemente associada com o desenvolvimento de inibidor ( $p=0,002$ ,  $OR=4,006$  [CI 95%: 1,667-9,628]). Essa análise ainda mostrou que o uso de plasma fresco congelado ( $p=0,011$ ,  $OR=2,18$  [CI 95%: 1.193-3.987]) e hemofilia grave ( $p=0,019$ ,  $OR=6,07$  [CI 95%: 1.341-27,510]) também são fatores de risco independentes para desenvolvimento de inibidor, enquanto idade, uso de crioprecipitado ou uso exclusivo de concentrado de fator derivado de plasma não foi significativamente associados com esse desfecho (MARTINS *et al.*, 2020).

Nos grupos sem e com exposição ao HCV, a maioria dos pacientes (56,4% e 55,2%, respectivamente) faziam tratamento profilático de reposição do FVIII, enquanto poucos (7,8% e 14,7%, respectivamente) estavam em tratamento de imunotolerância, sendo que não foi observada diferença estatística entre os grupos para estas duas variáveis (Tabela 3).

Em relação à presença de comorbidades desenvolvidas por esses pacientes, indivíduos HCV reativo apresentaram maior frequência (55,2%) e possuíam nove vezes mais chance de desenvolverem comorbidades ( $p<0,001$ ,  $OR=9,52$ ) que os pacientes soronegativos (Tabela 3). Algumas comorbidades observadas na população geral podem ser encontradas em pacientes com hemofilia com idade avançada, tais como colesterol alto, pressão alta e obesidade (ANGELINI *et al.*, 2016). Isto ocorre devido ao aumento da expectativa de vida dos portadores de hemofilia nas últimas décadas, a partir da utilização de fatores de coagulação seguros e terapia antiviral eficiente. Um estudo retrospectivo realizado na Itália analisou os tipos de câncer em pacientes com hemofilia. Oitenta e três por cento dos pacientes tinham HCV e 22% deles também tinham coinfeção com HIV, sendo que 43% dos cânceres eram relacionados ao HCV e 9% ao HIV. Cânceres relacionados a vírus foram mais frequentes e cânceres não relacionados a vírus foram menos frequentes em pacientes com hemofilia grave que naqueles com hemofilia leve/moderada ( $p=0.0004$ ) (TAGLIAFERRI *et al.*, 2012).

Além do mais, estudos apontam aumento do risco de morte em pacientes com hemofilia infectados pelo HCV (WALSH *et al.*, 2015). Na coorte de pacientes com hemofilia da Fundação Hemominas, Carmo e colaboradores (2019) mostraram que pacientes com anticorpos anti-HCV apresentaram três vezes mais chance de morte do que aqueles sem exposição prévia à infecção pelo HCV. Um estudo nos Estados Unidos mostrou que a causa de morte mais relatada em coortes antigas (até 1975) de pacientes com hemofilia estavam relacionadas ao fígado, como a insuficiência hepática: 33% dos pacientes com hemofilia grave e 26% com hemofilia leve. Entretanto, em coortes acompanhadas entre os anos de 1983 a 1992 não se observou relato de morte ligada ao fígado. Menos de 15% das mortes relatadas foi em decorrência das complicações da hemofilia em todos os períodos do estudo (MAZEPA *et al.*, 2016).

## **5.2 Características relacionadas à infecção pelo HCV nos pacientes com hemofilia A**

As características relacionadas à infecção pelo HCV nos pacientes com hemofilia A encontram-se apresentadas na Tabela 4. Conforme esperado, o HCV genótipo 1 foi o mais frequente dentre os pacientes com genótipo viral conhecido. O HCV genótipo 1 é o mais prevalente no mundo, com 46% das infecções pelo HCV, seguido de 30% pelo genótipo 3 (MESSINA *et al.*, 2015). Silva e colaboradores (2005) descreveram a distribuição dos genótipos do HCV em 50 pacientes com hemofilia acompanhados pelo HEMOBA (Bahia) evidenciando a predominância do genótipo 1 (74%), seguido pelo genótipo 3 (22%) e pelo genótipo 2 (4%). Na Fundação Hemominas, um estudo com 116 pacientes com hemofilia acompanhados entre os anos de 1985 a 1997 mostrou as seguintes frequências de genótipos do HCV: 84,5% genótipo 1; 8,6% genótipo 3; 2,6% genótipo 4 e 0,9% genótipo 2 (CARMO, *et al.*, 2002). Sendo assim, a circulação do HCV genótipo 1 é predominante entre a população brasileira, incluindo potenciais doadores de sangue, e também entre os pacientes com hemofilia que se infectaram por transfusão sanguínea.

**Tabela 4: Característica da infecção pelo HCV nos pacientes com hemofilia A da Fundação Hemominas, Belo Horizonte, MG, entre os anos de 1985 a 2018.**

Características	Frequência (%)
Genótipo HCV (n=101)	
1	52 (51,5)
3	13 (12,9)
4	1 (1,0)
Ignorado	35 (34,6)
Clearance viral espontâneo (n=101)	
Sim	30 (29,7)
Não	71 (70,3)
Infecção crônica (n=71)	
Sem alteração hepática	43 (60,6)
Alteração hepática	28 (39,4)
Indicação de Tratamento (n=101)	
Sim	23 (22,8)
Não	78 (77,2)
Realizou o tratamento (n=19)	
Completo	18 (94,7)
Incompleto <sup>a</sup>	1 (5,3)
Tratamentos utilizados (n=24)*	
IFN	2 (8,3)
IFN+RBV	7 (29,2)
Peg-IFN+RBV	13 (54,2)
Peg-IFN+RBV+IP	2 (8,3)
Resultado final do tratamento (n=19)	
Resposta virológica sustentada (RVS)	13 (68,4)
Resposta virológica com recidiva	4 (21,0)
Não respondedor pleno <sup>b</sup>	2 (10,6)
Deteccção de viremia no plasma (n=59)**	
Sim	42 (71,2)
Não	17 (28,8)

IFN: Interferon alfa; Peg-IFN: Interferon alfa peguilhado; RBV: Ribavirina; IP: Inibidor de protease viral.

\*Alguns pacientes foram submetidos a mais de um esquema terapêutico.

\*\*Deteccção de RNA de HCV nas amostras de plasma usadas para a dosagem de quimiocinas e citocinas. Foram testados apenas os pacientes sem *clearance* viral espontâneo ou sem RVS.

<sup>a</sup>Tratamento suspenso devido à falha de resposta. <sup>b</sup>Paciente apresentou intolerância e má adesão ao tratamento.

Quase 30% dos pacientes estudados apresentaram *clearance* viral espontâneo (Tabela 4), ou seja, foram capazes de desenvolver respostas imunes inatas e adaptativas que controlaram a multiplicação viral, até a sua eliminação e conseqüente não deteção de cópias virais. O *clearance* viral ocorre em 15 a 25% dos casos e pode chegar a mais de 45% em pessoas com icterícia, crianças e mulheres jovens (LINGALA & GHANY, 2015). Além disso, certos polimorfismos como rs12979860-C, rs8099917-T e rs469415590TT, próximo ao gene IL-28B, estão relacionados a altas taxas de *clearance* viral espontâneo (GE *et al.*,2009; TANAKA *et al.*,2009; PROKUNINA-OLSSON *et al.*,2013; LINGALA & GHANY, 2015).

Dos pacientes com hepatite C crônica, a maioria (60,6%) esteve assintomático (Tabela 4) e grande parte poderia permanecer assim por um longo período de tempo. Pacientes com hepatite C crônica podem desenvolver fibrose em aproximadamente 20 a 30% dos casos durante um período de 25 a 30 anos. Pode ocorrer evolução para cirrose, além de carcinoma hepatocelular em 1 a 4% dos casos (LINGALA & GHANY, 2015). Um estudo nos Estados Unidos realizado entre os anos 1998 a 2014 mostrou taxas semelhantes de hepatocarcinoma celular em homens com e sem hemofilia. Entretanto, através de regressão logística multivariável, o HCV foi considerado um forte preditor de hepatocarcinoma celular em pacientes com hemofilia (OR: 15,42 [CI 95%: 8,75 = 27,16]) (THALAPPILLIL *et al.*, 2018).

Apenas 22,8% dos pacientes com infecção crônica tiveram indicação para realizar tratamento para HCV, e nem todos foram tratados. O esquema terapêutico mais utilizado foi o uso do interferon alfa peguilado (PEG-IFN $\alpha$ ) associado à ribavirina, e a grande maioria (68,4%) obteve resposta virológica sustentada (Tabela 4). Devido aos vários efeitos colaterais e também às complicações relacionadas à doença genética de base, muitos pacientes não realizavam o tratamento para HCV, pois se mantinham assintomáticos, sendo que somente após décadas era possível observar alguma alteração hepática que levava à indicação para a realização do tratamento antiviral. Vale ressaltar que os dados relacionados ao tratamento são retrospectivos, portanto, diz respeito apenas aos esquemas terapêuticos utilizados antes de 2015. Com a introdução das DAAs como opção de esquema terapêutico, os pacientes que não eram elegíveis ao tratamento anterior podem agora receber o tratamento gratuitamente disponibilizado pelo SUS, cuja taxa de efetividade tem se mostrado acima de 90%. Em um estudo multicêntrico, a taxa de RVS foi de 93% em 12 semanas de tratamento (BRASIL, 2019; LANINI *et al.*, 2018).

Nos pacientes que mantêm a infecção crônica pelo HCV (sem *clearance* viral espontâneo ou sem RVS), a viremia de HCV no plasma foi detectada em 71,2% dos pacientes (Tabela 4). Em estudo prévio na mesma instituição, o RNA-HCV pôde ser detectado em 71,6% (116/162) dos pacientes com hemofilia, apresentando associação positiva com idade elevada e nível anormal de alanina aminotransferase (CARMO *et al.*, 2002). Em 66 pacientes com hemofilia e com anti-HCV positivo acompanhados no HEMOBA (Bahia) entre novembro de 1999 a agosto de 2000, o RNA-HCV foi detectado em 77,3% (51/66) dos casos (SILVA *et al.*, 2005). A carga viral é considerada preditiva para a resposta ao tratamento do HCV, sendo que uma menor carga viral é associada a maiores taxas de resposta virológica sustentada (LINGALA & GHANY, 2015). No presente estudo não foi avaliada a carga viral dos pacientes.

### **5.3 Análise dos biomarcadores de resposta imunológica nos pacientes com hemofilia A soronegativos ou com história de exposição ao HCV e sem ou com história de desenvolvimento de inibidor**

A formação de inibidores é um dos principais problemas no tratamento dos pacientes com hemofilia A. Inibidores são anticorpos anti-FVIII de alta afinidade que neutralizam a ação do fator de coagulação, sendo IgG4 e IgG1 as subclasses de IgG mais abundantes. Anticorpos anti-FVIII são principalmente do tipo IgG4 em pacientes com uma forte resposta anti-FVIII, enquanto que eles são principalmente do tipo IgG1 em pacientes com uma modesta resposta de anticorpos (HU *et al.*, 2007). Os pacientes com hemofilia A podem apresentar níveis baixos ou altos desses inibidores que podem ser continuamente produzidos ou desaparecer espontaneamente. Estudos mostraram que 27% dos pacientes com hemofilia A grave desenvolveram inibidores transitórios de FVIII nos meses seguintes após a primeira exposição ao FVIII terapêutico, e que o risco de desenvolvimento de inibidores em pacientes com hemofilia A grave é alto durante os 20 primeiros dias de exposição acumulada do fator infundido (ou seja, nos primeiros 3-4 anos de vida) (GOUW *et al.*, 2007; PEYVANDI *et al.*, 2016). Entretanto, foi relatada uma incidência aumentada de inibidores de FVIII em idade avançada (HAY *et al.*, 2011), tendo sido sugerido que essa ocorrência seria devido a falhas nos mecanismos de tolerância decorrente do envelhecimento (JAGGER *et al.*, 2014). Os mecanismos patofisiológicos que levam ao desenvolvimento de inibidores em pacientes com hemofilia não são completamente entendidos, mas está claro que o processo é complexo, com o envolvimento das respostas celular e humoral, de citocinas e de outras moléculas imune regulatórias. Assim, uma resposta imune robusta disparada por um outro agente externo pode interferir nesta resposta de formação de inibidor e neste sentido, este estudo investigou a influência da exposição ao HCV no desenvolvimento de inibidor pela análise dos níveis de citocinas e quimiocinas plasmáticas.

Os dados de comparação entre os pacientes sem e com história de exposição ao HCV (infecção passada e presente) mostraram que a infecção pelo vírus foi associada a diferentes características da hemofilia, incluindo uma maior chance de desenvolver inibidor, porém em menores níveis (Tabela 3). Isto levou ao questionamento se a resposta imune desencadeada frente à infecção pelo HCV modula a resposta que leva ao desenvolvimento de inibidor, e por sua vez, se a resposta que leva ao desenvolvimento de inibidor também pode modular a resposta à infecção viral. Para isso, foram analisadas as concentrações de citocinas e quimiocinas

plasmáticas nos seguintes grupos de pacientes: pacientes soronegativos e sem desenvolvimento de inibidor (SN<sup>INB-</sup>), pacientes soronegativos e com desenvolvimento de inibidor (SN<sup>INB+</sup>), pacientes com *clearance* de HCV e sem desenvolvimento de inibidor (*cl*-HCV<sup>INB-</sup>), pacientes com *clearance* de HCV e com desenvolvimento de inibidor (*cl*-HCV<sup>INB+</sup>), pacientes com infecção crônica pelo HCV sem desenvolvimento de inibidor (HCV<sup>INB-</sup>) e pacientes com infecção crônica pelo HCV com desenvolvimento de inibidor (HCV<sup>INB+</sup>). Dentre os pacientes que apresentaram *clearance* de HCV (infecção passada), estão aqueles com cura espontânea e com RVS. Esse grupo foi subdividido do grupo inicialmente definido como reativo para HCV, uma vez que a presença de uma infecção atual ativa do vírus pode influenciar o nível de citocinas e quimiocinas plasmáticas.

A Tabela 5 mostra a mediana das concentrações das citocinas e quimiocinas analisadas e as comparações intragrupo (com INB *versus* sem INB).

**Tabela 5: Concentrações de citocinas e quimiocinas plasmáticas em pacientes com hemofilia A da Fundação Hemominas, Belo Horizonte, MG, com ou sem exposição ao HCV e comparação entre aqueles com ou sem registro de desenvolvimento de inibidor do FVIII pertencentes ao mesmo grupo (intragrupo)**

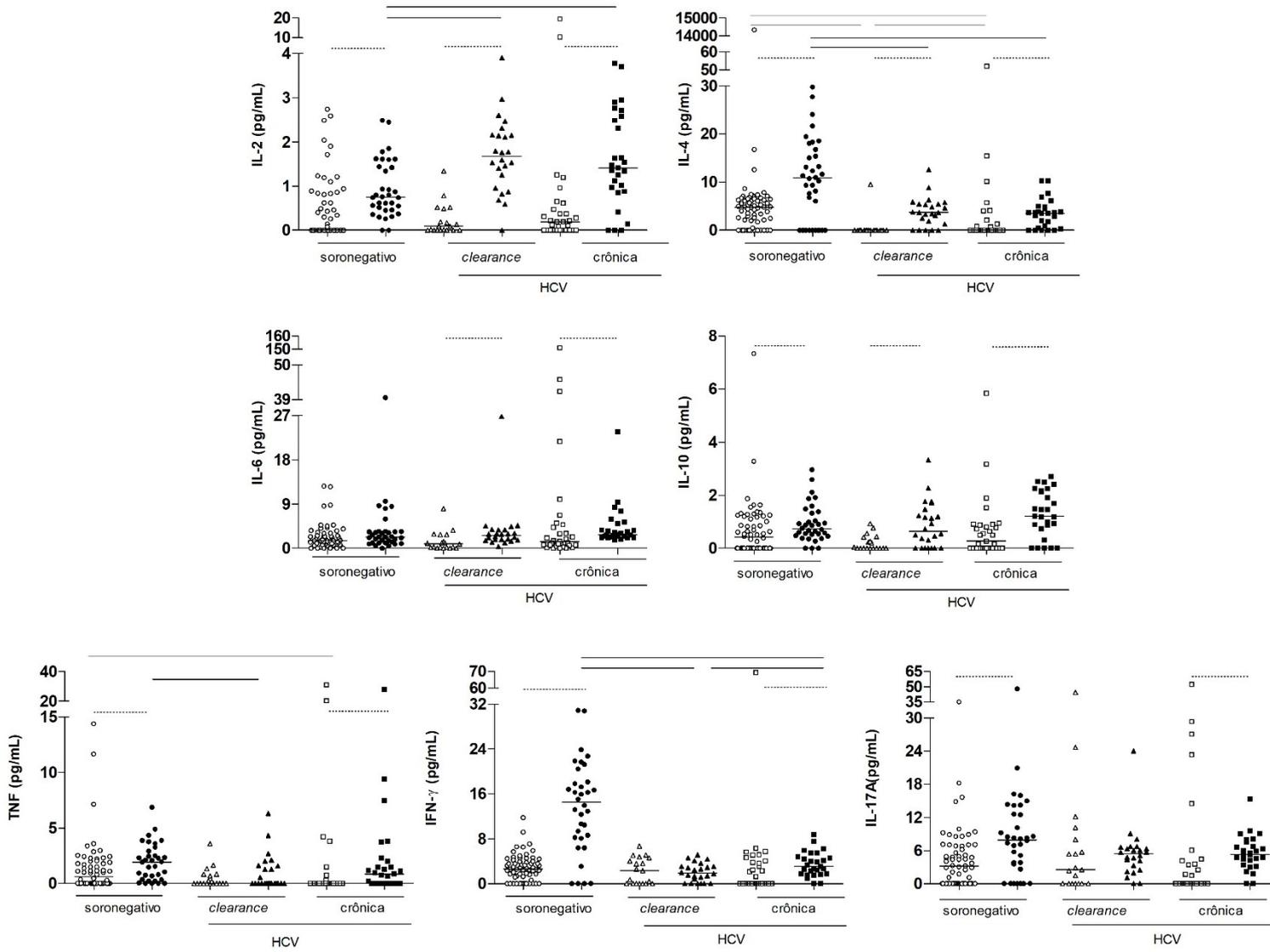
Biomarcadores (pg/mL)	Soronegativo (n=96)			Com exposição ao HCV (n=101)					
	SN <sup>INB-</sup> (n=62)	SN <sup>INB+</sup> (n=34)	P	<i>cl</i> -HCV <sup>INB-</sup> (n=19) <sup>a</sup>	<i>cl</i> -HCV <sup>INB+</sup> (n=24) <sup>b</sup>	P	HCV <sup>INB-</sup> (n=31)	HCV <sup>INB+</sup> (n=27)	P
IL-2	0,00	<b>0,75</b>	<0,001	0,09	<b>1,68</b>	<0,001	0,19	<b>1,41</b>	<0,001
IL-4	4,75	<b>10,85</b>	<0,001	0,00	<b>3,69</b>	<0,001	0,00	<b>3,53</b>	0,002
IL-6	1,55	2,31	0,096	0,89	<b>2,62</b>	<0,001	1,34	<b>2,84</b>	0,013
IL-10	0,42	<b>0,73</b>	0,009	0,00	<b>0,64</b>	0,006	0,27	<b>1,21</b>	0,001
TNF	0,63	<b>1,94</b>	0,004	0,00	0,00	0,595	0,00	<b>0,85</b>	0,007
IFN- $\gamma$	2,64	<b>14,51</b>	<0,001	2,36	1,89	0,901	0,00	<b>3,09</b>	0,016
IL-17A	3,23	<b>7,94</b>	0,002	2,56	5,39	0,238	0,00	<b>5,29</b>	<0,001
CXCL8	1,50	1,86	0,055	<b>2,70</b>	0,00	<0,001	<b>3,41</b>	0,00	<0,001
CCL5	1634	1642	0,321	1592	1014	0,072	1460	1390	0,533
CCL2	10,21	9,70	0,969	<b>17,80</b>	8,11	0,007	<b>15,89</b>	8,29	0,010
CXCL9	26,31	<b>74,20</b>	<0,001	23,49	<b>294,2</b>	<0,001	44,37	<b>294,4</b>	<0,001
CXCL10	308,1	367,9	0,265	187,5	<b>519,6</b>	<0,001	449,4	<b>1069</b>	0,001

SN: soronegativo; *cl*-HCV: pacientes com infecção passada pelo HCV (<sup>a</sup>13 pacientes com cura espontânea e 6 com RVS; <sup>b</sup>17 pacientes com cura espontânea e 7 com RVS); HCV: Pacientes com infecção crônica pelo HCV. INB<sup>-</sup>: sem inibidor; INB<sup>+</sup>: com inibidor

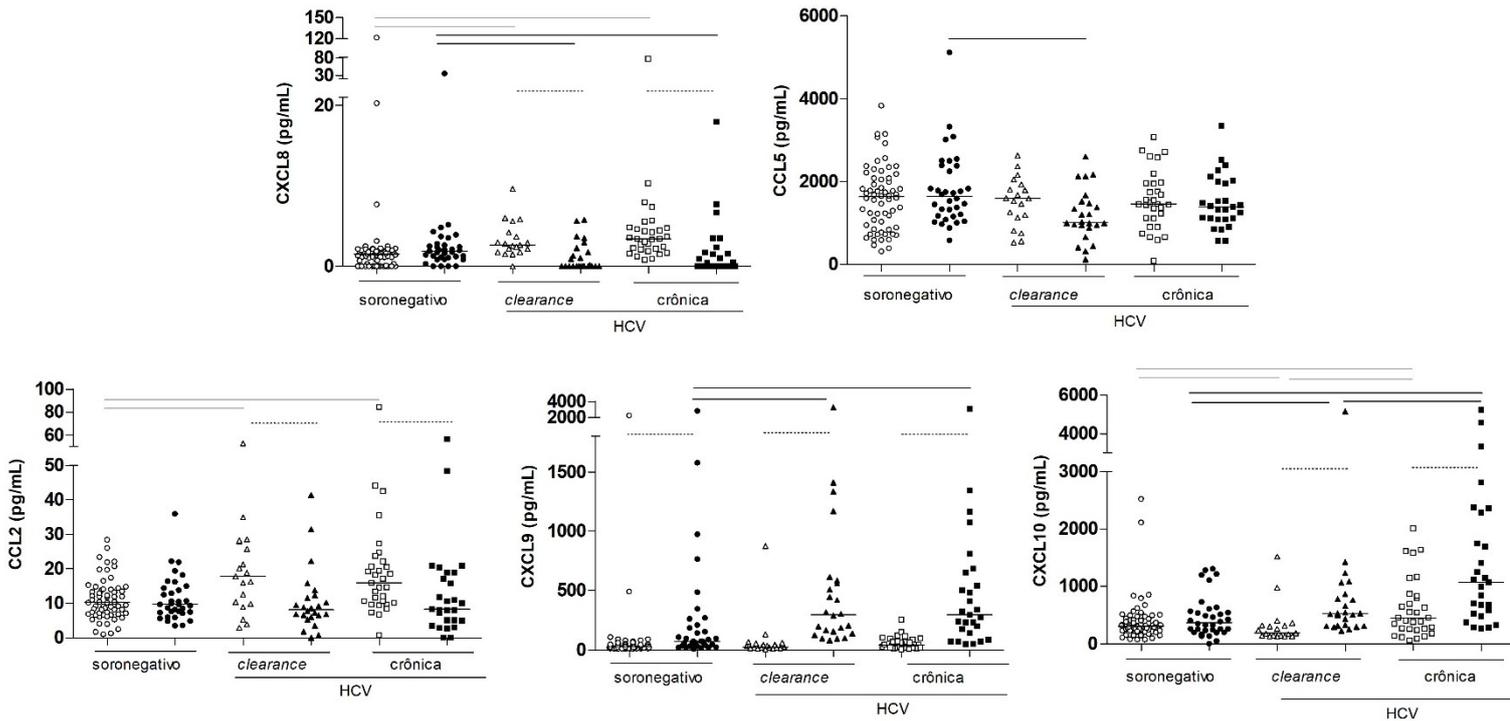
Os valores representam a mediana da concentração em pg/mL. Foi usado o Teste Mann-Whitney na comparação dos grupos com significância estatística de p<0,05.

No grupo SN, todas as citocinas analisadas apresentaram níveis significativamente mais elevados nos pacientes com inibidor, exceto para IL-6. O mesmo foi observado no grupo infecção crônica para todas as citocinas. Já no grupo com infecção passada de HCV (*cl*-HCV),

os pacientes com inibidor mostraram níveis significativamente mais altos de IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 em comparação com aqueles sem inibidor, mas não para TNF, IFN- $\gamma$  e IL-17A. Analisando-se as quimiocinas nas comparações intragrupos, níveis significativamente mais elevados de CXCL8 e de CCL2 foram observados nos pacientes sem inibidor em comparação com aqueles com inibidor pertencentes aos grupos com infecção passada (*clearance*) ou presente de HCV. Pelo contrário, uma relação inversa foi observada em relação às quimiocinas CXCL9 e CXCL10 nestes dois grupos, visto que os pacientes com inibidor apresentaram níveis mais elevados destas quimiocinas em comparação com aqueles sem inibidor. Já as concentrações de CCL5 não foram estatisticamente diferentes entre os pacientes com ou sem inibidor, pertencentes a estes dois grupos. Por outro lado, no grupo SN a única diferença significativa foi observada para CXCL9, com maiores níveis nos pacientes com inibidor em comparação àqueles sem inibidor. A distribuição das concentrações das citocinas e quimiocinas nos grupos são mostradas nas Figuras 19 e 20.



**Figura 17: Concentrações de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-17A no plasma de pacientes com hemofilia A soronegativos para o HCV ou com infecção passada (*clearance*) ou presente (crônica) de HCV e sem (símbolos brancos) ou com (símbolos pretos) história de desenvolvimento de inibidor. As linhas superiores indicam diferenças significativas na comparação entre os grupos: linhas pontilhadas apontam diferenças intragrupos; linhas pretas apontam diferenças intergrupos de pacientes com história de desenvolvimento de inibidor e linhas cinzas apontam diferenças intergrupos de pacientes sem o desenvolvimento de inibidor. Foi usado o Teste de Mann-Whitney na comparação dos grupos com significância estatística de  $p < 0,05$ .**



**Figura 18: Concentrações de CXCL8, CCL2, CCL5, CXCL9 e CXCL10 no plasma de pacientes com hemofilia A soronegativos para o HCV ou com infecção passada (*clearance*) ou presente (*crônica*) de HCV e sem (símbolos brancos) ou com (símbolos pretos) história de desenvolvimento de inibidor. As linhas superiores indicam diferenças significativas na comparação entre os grupos: linhas pontilhadas apontam diferenças intragrupos; linhas pretas apontam diferenças intergrupos de pacientes com história de desenvolvimento de inibidor e linhas cinzas apontam diferenças intergrupos de pacientes sem desenvolvimento de inibidor. Foi usado o Teste de Mann-Whitney na comparação dos grupos com significância estatística de  $p < 0,05$ .**

Também foram feitas as comparações intergrupos, comparando os três grupos de pacientes com diferentes *status* de infecção pelo HCV, mas apenas entre aqueles sem inibidor (Tabela 6), ou entre aqueles com inibidor (Tabela 7).

**Tabela 6: Comparações das concentrações de citocinas e quimiocinas plasmáticas entre grupos de pacientes com hemofilia A da Fundação Hemominas, Belo Horizonte, MG, com diferentes *status* de infecção pelo HCV e sem história de desenvolvimento de inibidor do FVIII**

Biomarcadores	Concentração dos biomarcadores (valor p) nos grupos INB <sup>+</sup>		
	SN vs. <i>CI</i> -HCV	SN vs. HCV	<i>CI</i> -HCV vs. HCV
<b>IL-2</b>	0,00 vs. 0,09 (0,824)	0,00 vs. 0,19 (0,488)	0,09 vs. 0,19 (0,558)
<b>IL-4</b>	<b>4,75</b> vs. 0,00 (<0,001)	<b>4,75</b> vs. 0,00 (<0,001)	0,00 vs. <b>0,00</b> (0,034)
<b>IL-6</b>	<b>1,55</b> vs. 0,89 (0,025)	1,55 vs. 1,34 (0,845)	0,89 vs. 1,34 (0,099)
<b>IL-10</b>	0,42 vs. 0,00 (0,071)	0,42 vs. 0,27 (0,848)	0,00 vs. 0,27 (0,125)
<b>TNF</b>	0,63 vs. 1,94 (0,079)	<b>0,63</b> vs. 0,00 (0,009)	0,00 vs. 0,00 (0,300)
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	2,64 vs. 2,36 (0,486)	2,64 vs. 0,00 (0,081)	2,36 vs. 0,00 (0,570)
<b>IL-17A</b>	3,23 vs. 2,56 (0,896)	3,23 vs. 0,00 (0,080)	2,56 vs. 0,00 (0,204)
<b>CXCL8</b>	1,50 vs. <b>2,70</b> (<0,001)	1,50 vs. <b>3,41</b> (<0,001)	2,70 vs. 3,41 (0,407)
<b>CCL5</b>	1634 vs. 1592 (0,793)	1634 vs. 1460 (0,797)	1592 vs. 1460 (0,920)
<b>CCL2</b>	10,21 vs. <b>17,80</b> (0,006)	10,21 vs. <b>15,89</b> (<0,001)	17,80 vs. 15,89 (0,764)
<b>CXCL9</b>	26,31 vs. 23,49 (0,811)	26,31 vs. 44,37 (0,054)	23,49 vs. 44,37 (0,246)
<b>CXCL10</b>	<b>308,1</b> vs. 187,5 (0,049)	308,1 vs. <b>449,4</b> (0,033)	187,5 vs. <b>449,4</b> (0,014)

SN: soronegativo; *CI*-HCV: pacientes com infecção passada pelo HCV (13 pacientes com cura espontânea e 6 com RVS); HCV: Pacientes com infecção crônica pelo HCV.

Os valores representam a mediana da concentração em pg/mL. Foi usado o Teste Mann-Whitney na comparação dos grupos com significância estatística de  $p < 0,05$ .

**Tabela 7: Comparações das concentrações de citocinas e quimiocinas plasmáticas entre grupos de pacientes com hemofilia A da Fundação Hemominas, Belo Horizonte, MG com diferentes *status* de infecção pelo HCV e com história de desenvolvimento de inibidor do FVIII**

Biomarcadores	Concentração dos biomarcadores (valor p) nos grupos INB <sup>+</sup>		
	SN vs. <i>CI</i> -HCV	SN vs. HCV	<i>CI</i> -HCV vs. HCV
<b>IL-2</b>	0,75 vs. <b>1,68</b> (<0,001)	0,75 vs. <b>1,41</b> (0,012)	1,68 vs. 1,41 (0,637)
<b>IL-4</b>	<b>10,85</b> vs. 3,69 (0,002)	<b>10,85</b> vs. 3,53 (0,002)	3,69 vs. 3,53 (0,609)
<b>IL-6</b>	2,31 vs. 2,62 (0,625)	2,31 vs. <b>2,84</b> (0,050)	2,62 vs. 2,84 (0,113)
<b>IL-10</b>	0,73 vs. 0,64 (0,522)	0,73 vs. 1,21 (0,061)	0,64 vs. 1,21 (0,079)
<b>TNF</b>	<b>1,94</b> vs. 0,00 (0,002)	1,94 vs. 0,85 (0,075)	0,00 vs. 0,85 (0,268)
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	<b>14,51</b> vs. 1,89 (<0,001)	<b>14,51</b> vs. 3,09 (<0,001)	1,89 vs. <b>3,09</b> (0,018)
<b>IL-17A</b>	7,94 vs. 5,39 (0,054)	7,94 vs. 5,29 (0,111)	5,39 vs. 5,29 (0,610)
<b>CXCL8</b>	<b>1,86</b> vs. 0,00 (0,010)	<b>1,86</b> vs. 0,00 (0,007)	0,00 vs. 0,00 (0,911)
<b>CCL5</b>	<b>1642</b> vs. 1014 (0,002)	1642 vs. 1390 (0,170)	1014 vs. 1390 (0,091)
<b>CCL2</b>	9,70 vs. 8,11 (0,236)	9,70 vs. 8,29 (0,674)	8,11 vs. 8,29 (0,678)
<b>CXCL9</b>	74,20 vs. <b>294,2</b> (<0,001)	74,20 vs. <b>294,4</b> (<0,001)	294,2 vs. 294,4 (0,902)
<b>CXCL10</b>	367,9 vs. <b>519,6</b> (0,048)	367,9 vs. <b>1069</b> (<0,001)	519,6 vs. <b>1069</b> (0,013)

SN: soronegativo; *CI*-HCV: pacientes com infecção passada pelo HCV (17 pacientes com cura espontânea e 7 com RVS); HCV: Pacientes com infecção crônica pelo HCV.

Os valores representam a mediana da concentração em pg/mL. Foi usado o Teste Mann-Whitney na comparação dos grupos com significância estatística de  $p < 0,05$ .

Na comparação dos grupos de pacientes sem inibidor, o grupo SN mostrou concentrações significativamente mais altas de IL-4, tanto em comparação com o grupo *cl*-HCV quanto com o grupo HCV. Essa citocina também estava com concentrações significativamente mais altas no grupo de pacientes com infecção crônica em comparação aos pacientes com infecção passada de HCV. As únicas outras citocinas com níveis significativamente diferentes entre os grupos foram IL-6 e TNF, e novamente o grupo SN apresentou concentrações mais altas em comparação com os grupos *cl*-HCV e HCV, respectivamente (Tabela 6 e Figura 17). Na análise das quimiocinas observou-se uma tendência contrária ao encontrado para as citocinas, pois os pacientes com infecção passada ou presente pelo HCV apresentaram níveis significativamente mais elevados das quimiocinas CXCL8 e CCL2 quando comparados ao grupo SN. Porém, os pacientes com infecção passada de HCV mostraram os mais baixos níveis de CXCL10, em comparação a ambos os grupos SN ou com infecção crônica, enquanto que o grupo HCV apresentou os níveis mais altos desta quimiocina (Tabela 6 e Figura 18).

Em relação aos grupos de pacientes com inibidor, as comparações intergrupos mostraram diferenças significativas para um número muito maior de biomarcadores que o observado na comparação dos grupos de pacientes sem inibidor. Observou-se maior concentração de IL-2 nos grupos *cl*-HCV e HCV, ambos em comparação ao grupo SN. Níveis significativamente mais elevados de IL-4 e surpreendentemente de IFN- $\gamma$  foram vistos no grupo SN em comparação aos grupos *cl*-HCV e HCV. As concentrações de IFN- $\gamma$  nos grupos *cl*-HCV e HCV também foram significativamente diferentes, sendo mais elevadas no grupo HCV. E os níveis de TNF também foram mais altos no grupo SN, porém a diferença só foi significativa em comparação ao grupo *cl*-HCV (Tabela 7 e Figura 17). Em relação às quimiocinas, as concentrações de CXCL8 foram mais altas no grupo SN que nos grupos com infecção passada ou presente de HCV, ao contrário do que foi observado nos pacientes sem inibidor. CCL5 também teve níveis mais elevados no grupo SN, mas a diferença só foi significativa em comparação com o grupo *cl*-HCV. Por sua vez, concentrações significativamente maiores de CXCL9 e de CXCL10 foram observadas nos grupos *cl*-HCV e HCV que no grupo SN. CXCL10 também foi significativamente mais alta no grupo de pacientes com infecção presente em comparação àqueles com infecção passada pelo HCV (Tabela 7 e Figura 18).

A síntese de inibidor requer células T CD4<sup>+</sup> específicas para o FVIII, que são comuns no sangue de pacientes com hemofilia A, mas também em indivíduos saudáveis. Dados da literatura vêm mostrando que após a ativação por um antígeno, células T CD4<sup>+</sup> se diferenciam em subconjuntos celulares com funções e produção diferente de citocinas e moléculas regulatórias.

Tipicamente, células Th1 secretam citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  que facilitam o desenvolvimento de respostas imunes pela ativação de células apresentadoras de antígenos. As citocinas Th1 estimulam as células B a produzir anticorpos que se ligam ao complemento, como IgG1 e IgG2 em humanos. Células Th2 produzem citocinas anti-inflamatórias/regulatórias, como IL-4 e IL-10, que reduzem a intensidade das respostas imunes pela regulação negativa das células apresentadoras de antígeno ativadas e das células Th1. Entretanto, IL-4 e IL-10 também induzem crescimento e diferenciação de células B e promovem a síntese de anticorpos que não fixa complemento, como IgE e IgG4 em humanos. Lembrando que IgG4 é o principal subtipo de anticorpo em pacientes com hemofilia A com forte resposta de inibidor. Já as células Treg produzem moléculas regulatórias como TGF- $\beta$ , que são potentes reguladores das respostas de células T e humorais (revisto por HU *et al.*, 2007). A partir da análise *ex vivo* de blastos de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , IL-4 e TGF- $\beta$ 1 em cultivo, Hu e colaboradores (2007) observam que blastos produtores de IFN- $\gamma$  e IL-4 de pacientes com hemofilia A com inibidores aumentam significativamente após o estímulo das células com fator VIII, o que não ocorreu com as células produtoras de TGF- $\beta$ 1. No entanto, a indução com FVIII de amostras dos pacientes sem inibidores mostra blastos de células T CD4<sup>+</sup> produzindo IFN- $\gamma$  e TGF- $\beta$ 1, mas não produzindo IL-4. Os controles saudáveis não apresentam blastos produzindo IL-4, mas tem blastos produzindo IFN- $\gamma$  quando prolifera em resposta ao FVIII ou blastos produzindo TGF- $\beta$ 1 quando não houve proliferação em resposta ao estímulo. Os resultados sugeriram que a exposição ao FVIII terapêutico ou endógeno sensibiliza primeiramente as células Th1, e que a sensibilização das células Th2, que mantém a intensidade da resposta de inibidores, necessita da ação pró-inflamatória das citocinas da resposta Th1. Por outro lado, a ativação de células T CD4<sup>+</sup> potencialmente modulatórias que produzem TGF- $\beta$ 1 poderia ocorrer apenas após exposição prolongada ao FVIII, e não seria favorecida em pacientes com hemofilia A por causa da carência sustentada de níveis de FVIII, o que acaba por permitir a formação de inibidores. Em suma, a preponderância das respostas Th1 e Th2 parece ser essencial para o desenvolvimento de inibidores. Isso está de acordo com o que foi observado no presente trabalho na comparação intragrupo dos pacientes com hemofilia A sem ou com história de desenvolvimento de inibidores (INB- vs. INB+, Tabela 5). Os resultados mostraram que os pacientes com inibidores apresentaram níveis plasmáticos significativamente mais altos das citocinas característica das respostas Th1 e Th2, exceto o grupo com infecção passada do HCV, em que não houve diferença significativa nas concentrações de IFN- $\gamma$  e TNF entre os pacientes sem ou com inibidor (*cl*-HCV<sup>INB-</sup> vs. *cl*-HCV<sup>INB+</sup>, Tabela 5). A história de exposição ao HCV modificou esse quadro, como observado nas comparações das concentrações de

citocinas plasmáticas entre grupos de pacientes com hemofilia A com diferentes *status* de infecção pelo HCV e com história de desenvolvimento de inibidor (Tabela 7): IL-2 mostrou-se aumentada nos pacientes com exposição ao HCV, enquanto que IL-4 e IFN- $\gamma$  apresentaram níveis mais elevados nos pacientes sem exposição ao vírus.

Estudos mostram que pacientes com hepatite C crônica sem hemofilia apresentam elevados níveis de IFN- $\gamma$  e de quimiocinas induzíveis por IFN $\gamma$ , como CXCL9, -10, -11 em hepatócitos e linfócitos, e isso está relacionado com o grau de inflamação (PATZWAHL *et al.*, 2001; ITOH *et al.*, 2001; MURATA *et al.*, 2002; MIHM *et al.*, 2003; ANTONELLI *et al.*, 2008). Alto nível de CXCL10 em líquidos periféricos pode ser considerado um marcador da resposta imune orientada por Th1. Os linfócitos Th1 ativados promovem um aumento na produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , o que promove a estimulação da produção de CXCL10 (FERRI *et al.*, 2007a; FERRI *et al.*, 2007b). Portanto, em pacientes com hepatite C crônica, os níveis dessa quimiocina estão elevadas tanto no meio intra-hepático quanto no sangue periférico, de modo que CXCL10 pode inclusive ter utilidade prognóstica para resposta ao tratamento desses pacientes (ZEREMSKI *et al.*, 2007; ZEREMSKI *et al.*, 2008). Os altos níveis de CXCL10 nos pacientes com HCV crônica em comparação aos pacientes com *clearance* viral e com os pacientes soronegativos estão de acordo com estas observações. Porém, foram observados baixos níveis de IFN- $\gamma$  nos pacientes reativos ao HCV. Isto pode ser devido à migração dos linfócitos Th1 produtores de IFN- $\gamma$  e TNF para o tecido infectado, e por isso essas citocinas estão em baixo nível no sangue periférico. No entanto, essa hipótese não foi testada no presente estudo.

Considerando que nesse estudo está sendo avaliada a relação da infecção pelo HCV com o desenvolvimento de inibidor em algum momento da vida do paciente, sem a possibilidade de se definir quando cada um desses eventos ocorreu, e que os grupos de pacientes com infecção passada ou presente de HCV foram muito similares entre si, sem diferenças significativas nas concentrações das citocinas e quimiocinas analisadas, exceto para IL-4, IFN- $\gamma$  e CXCL10 (Tabelas 7 e 8), esses grupos, de acordo com a história de desenvolvimento de inibidor, foram agrupados num único grupo nas análises seguintes, passando a ser designado de grupo HCV. Assim, o grupo de pacientes com exposição ao HCV sem história de desenvolvimento de inibidor (HCV<sup>INB-</sup>) foi composto por 19 (38%) indivíduos com infecção passada e 31 (62%) com infecção crônica, e o grupo com desenvolvimento de inibidor (HCV<sup>INB+</sup>) foi composto por 24 (47,1%) pessoas com infecção passada e 27 (52,9%) com infecção crônica. Essas proporções de infecção passada e presente entre os grupos não foram significativamente diferentes

( $p=0,423$ ). A mediana da concentração dos biomarcadores nestes dois grupos é mostrada na Tabela 8.

**Tabela 8: Concentrações de citocinas e quimiocinas plasmáticas em pacientes com hemofilia A, da Fundação Hemominas, Belo Horizonte, MG, com exposição ao HCV e com ou sem registro de desenvolvimento de inibidor do FVIII**

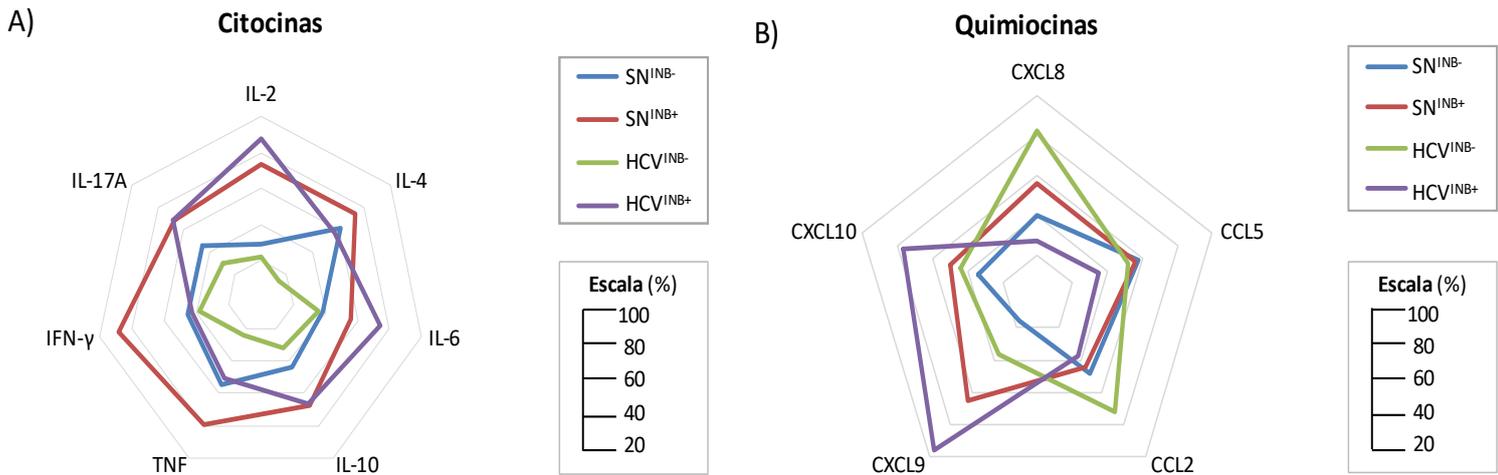
<b>Biomarcadores (pg/ml)</b>	<b>HCV<sup>INB-</sup> (n=50)</b>	<b>HCV<sup>INB+</sup> (n=51)</b>	<b>p</b>
IL-2	0,11	<b>1,53</b>	<0,001
IL-4	0,00	<b>3,57</b>	<0,001
IL-6	1,05	<b>2,84</b>	<0,001
IL-10	0,16	<b>1,13</b>	<0,001
TNF	0,00	<b>0,55</b>	0,014
IFN- $\gamma$	1,00	2,59	0,084
IL-17A	0,75	<b>5,29</b>	<0,001
CXCL8	<b>2,95</b>	0,00	<0,001
CCL5	1511	1249	0,084
CCL2	<b>16,68</b>	8,29	<0,001
CXCL9	33,99	<b>294,4</b>	<0,001
CXCL10	317,0	<b>675,5</b>	<0,001

HCV: Pacientes com infecção crônica pelo HCV. Os valores representam a mediana da concentração em pg/mL. Foi usado o Teste Mann-Whitney na comparação dos grupos com significância estatística ( $p<0,05$ ).

Conforme esperado, as concentrações das citocinas foram significativamente mais elevadas no grupo com inibidor, exceto para IFN- $\gamma$ , em que não houve diferença significativa (Tabela 8). Quanto às quimiocinas, CXCL8 e CCL2 mostraram maiores níveis no grupo sem inibidor, enquanto que CXCL9 e CXCL10 apresentaram concentrações muito mais elevadas no grupo com história de desenvolvimento de inibidor (Tabela 8).

#### **5.4 Análise da frequência de altos produtores de citocinas e quimiocinas plasmáticas nos grupos de pacientes com hemofilia A**

Para caracterizar o microambiente de citocinas e quimiocinas plasmáticas nos grupos de pacientes com e sem exposição ao HCV e com história ou não de desenvolvimento de inibidor, foi analisada a frequência de indivíduos altos produtores desses biomarcadores. Para cada um dos analitos dosados, foram considerados altos produtores os indivíduos com valores iguais ou acima da mediana da concentração do biomarcador considerando-se todos os pacientes analisados, sendo essa frequência representada por gráficos de radar (Figura 19).



Biomarcadores	Comparação da frequência de altos produtores entre os grupos					
	SN <sup>INB-</sup> vs. SN <sup>INB+</sup>	SN <sup>INB-</sup> vs. HCV <sup>INB-</sup>	SN <sup>INB-</sup> vs. HCV <sup>INB+</sup>	SN <sup>INB+</sup> vs. HCV <sup>INB-</sup>	SN <sup>INB+</sup> vs. HCV <sup>INB+</sup>	HCV <sup>INB-</sup> vs. HCV <sup>INB+</sup>
IL-2	<0,001	0,516	<0,001	<0,001	0,092	<0,001
IL-4	0,267	<0,001	0,702	<0,001	0,168	<0,001
IL-6	0,134	0,845	<0,001	0,079	0,100	0,001
IL-10	0,033	0,244	0,022	0,002	1,000	<0,001
TNF	0,026	0,001	0,7085	<0,001	0,012	0,007
IFN-γ	<0,001	0,564	0,8512	<0,001	<0,001	0,687
IL-17A	0,054	0,120	0,014	<0,001	1,000	<0,001
CXCL8	0,199	<0,001	0,169	0,014	0,012	<0,001
CCL5	1,000	0,569	0,023	0,825	0,076	0,110
CCL2	0,831	0,013	0,258	0,013	0,652	<0,001
CXCL9	<0,001	0,027	<0,001	0,014	<0,001	<0,001
CXCL10	0,1334	0,330	<0,001	0,659	0,019	0,001

**Figura 19: Frequência de altos produtores de citocinas e quimiocinas plasmáticas em pacientes com hemofilia A classificados em diferentes grupos.** SN<sup>INB-</sup>: soronegativo, sem desenvolvimento de inibidor (n=62); SN<sup>INB+</sup>: soronegativo, com história de desenvolvimento de inibidor (n=34); HCV<sup>INB-</sup>: com infecção passada ou presente de HCV sem desenvolvimento de inibidor (n=50); HCV<sup>INB+</sup>: com infecção passada ou presente de HCV e com história de desenvolvimento de inibidor (n=51). A tabela mostra os valores de p da comparação da frequência de altos produtores entre os grupos pelo Teste exato de Fisher.

Ao analisar o perfil das citocinas dosadas nos quatro grupos de pacientes, ambos os grupos sem história de desenvolvimento de inibidor (INB<sup>-</sup>) apresentaram menor frequência de alto produtores para a maioria das citocinas dosadas. Porém, no grupo SN<sup>INB-</sup>, destacou-se uma maior frequência de altos produtores de IL-4 dentre as demais citocinas analisadas (Figura 19), o que caracteriza um perfil de resposta predominantemente do tipo Th2. Isto pode sugerir que

estes pacientes, soronegativos ao HCV, mas com exposição constante ao FVIII exógeno, estão propensos a desencadear uma resposta que leva à formação de anticorpos anti-FVIII, mas que por enquanto está sendo controlada. Já os pacientes HCV<sup>INB-</sup> mostraram que são baixos produtores de citocinas Th1 e Th2, assim como de CXCL9 e de CXCL10, apesar de serem na sua maioria altos produtores de CXCL8 e de CCL2 (Figura 19). Este é um perfil completamente diferente dos grupos HCV<sup>INB+</sup> e SN<sup>INB-</sup>. CXCL8 é o principal mediador da resposta inflamatória com papel no recrutamento e ativação de neutrófilos, linfócitos e basófilos, sendo um marcador de resposta pró-inflamatória Th17. CCL2, por sua vez, tem ação sobre monócitos, linfócitos e basófilos e pode potencializar a produção de IL-4 por células T ativadas, que levaria ao fenótipo Th2. No entanto, não se observou alta produção desta interleucina pelos pacientes deste grupo. Assim, essas quimiocinas podem ter um papel na quimiotaxia das células para o foco da infecção viral (fígado), assim como CXCL9 e CXCL10 parecem ter no grupo HCV<sup>INB+</sup>. Níveis aumentados de CCL2 e de CXCL8 foram observados nos pacientes infectados com HCV. CCL2 é considerado um fator central responsável pela ativação de macrófago e recrutamento de monócitos e macrófagos para o fígado. CXCL8 está envolvido no recrutamento de neutrófilos e monócitos para o fígado. Na fase inicial da infecção, a imunidade celular antiviral é iniciada pelas células de Kupffer que liberam CCL2, resultando no recrutamento de monócitos e células dendríticas plasmáticas produtoras de CCL3, as quais atraem células NK. Quando a infecção persiste, a expressão de CXCL8 se correlaciona com a gravidade da inflamação (BRASS & BRENNDÖRFER, 2014). A baixa produção de citocinas no grupo HCV<sup>INB-</sup>, especialmente de IL-4, sugere a ocorrência de um mecanismo de imunotolerância que impede o desenvolvimento de uma resposta Th2 efetiva para a formação de inibidor.

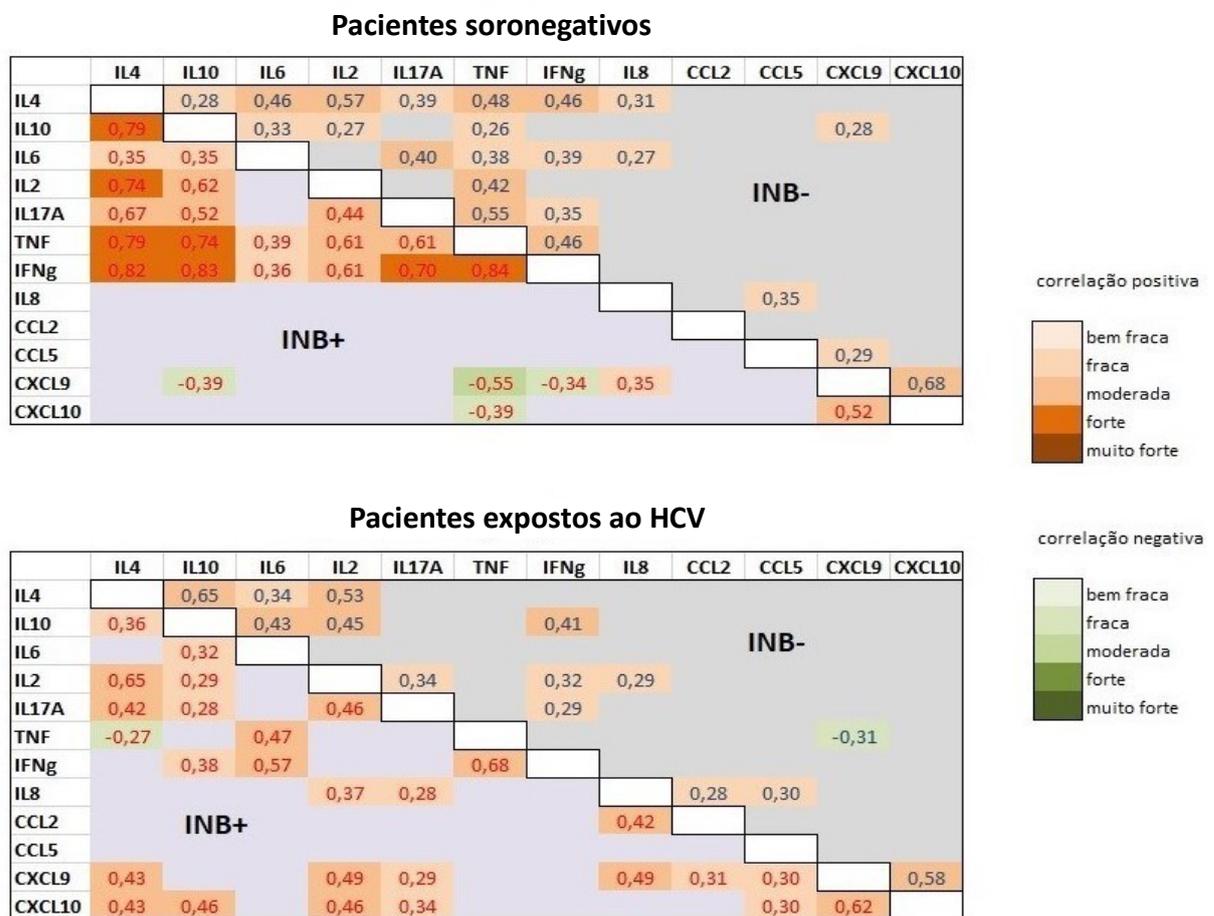
O grupo SN<sup>INB+</sup> se destacou pelas altas frequências de altos produtores de IFN- $\gamma$  e TNF em comparação aos outros grupos, mas também de IL-4 e de IL-10 (Figura 19). Este perfil pode sugerir uma resposta Th2 estimulada por IL-4, e modulação da resposta Th1 pela alta produção de IL-10. Ao contrário do que se observou no grupo SN<sup>INB+</sup>, o grupo HCV<sup>INB+</sup> apresentou baixas frequências de altos produtores de IFN- $\gamma$  e TNF, assim como o grupo HCV<sup>INB-</sup>, mas não de IL-2 (Figura 19). IL-2 é importante para a proliferação clonal e ativação de linfócitos T específica a antígenos, indicando que uma resposta ativa de células T deve estar ocorrendo. Assim, a baixa frequência de altos produtores de citocinas Th1 no plasma destes pacientes, ao mesmo tempo em que se observa elevada frequência de altos produtores das quimiocinas CXCL9 e CXCL10, pode ser devida à migração das células Th1 produtoras de IFN- $\gamma$  e TNF para o foco inflamatório, no combate aos hepatócitos infectados. A produção de CXCL9 e CXCL10 é induzida por IFN-

$\gamma$ , o que sugere que a produção e circulação de IFN- $\gamma$  deve estar concentrada no fígado. Para comprovar essa hipótese, seria necessário avaliar a concentração desses biomarcadores no fígado. CXCL10 e outras quimiocinas que se ligam ao CXCR3 são quimiotáticas para células Th1, NK e NKT e estão envolvidas na patogênese da infecção aguda e crônica pelo HCV. O receptor CXCR3 está associado à resposta Th1, sendo expresso nas células de resposta imune, mas também nas células estreladas do fígado. Na hepatite C crônica, a expressão de IFN- $\gamma$  e/ou TNF- $\alpha$  pelo HCV e por várias células residentes do fígado leva a um aumento da expressão de CXCL9 e -10 intra-hepática, de modo a promover o contínuo recrutamento de células T expressando CXCR3 para o lóbulo hepático. CXCL10 tem um papel chave no desenvolvimento de necroinflamação e fibrose no parênquima hepático na hepatite C crônica. Assim, como níveis plasmáticos de CXCL10 são significativamente mais altos nos pacientes com fibrose avançada, o uso desta quimiocina como biomarcador de lesão hepática tem sido sugerido. Por outro lado, CXCL10 também é considerado um marcador prognóstico para o *clearance* e sucesso da terapia nos pacientes com hepatite C crônica (BRASS & BRENNDÖRFER, 2014; FERRARI *et al.*, 2019). Assim, no presente estudo, os baixos níveis de IFN- $\gamma$  e os altos níveis de CXCL9 e CXCL10 no grupo HCV<sup>INB+</sup> podem indicar muito mais uma resposta Th1 localizada e não uma ausência desta resposta. Alta frequência de altos produtores de IL-2, IL-6 e IL-17A indicam que este grupo pode ter uma resposta imune periférica caracterizada pelo tipo Th17, e não Th1 ou Th2.

No conjunto dos dados, maiores frequências de altos produtores de citocinas plasmáticas parecem ser devidas principalmente à resposta imune que leva à produção de anticorpos inibidores (grupos INB-), e não à resposta antiviral. Porém, IFN- $\gamma$ , TNF e IL-4 parecem ser as citocinas chaves que são moduladas diferentemente quando as duas respostas estão presentes. Já a modulação de quimiocinas parece estar mais diretamente relacionada com a resposta imune gerada pela exposição ao HCV, por ter um papel na migração de linfócitos e outras células do sistema imune ao foco da infecção, sendo as quimiocinas chaves CXCL9 e CXCL10 quando se tem a infecção pelo HCV e uma resposta concorrente de formação de inibidor.

### 5.5 Análise da correlação entre as citocinas e quimiocinas nos pacientes com hemofilia A classificados de acordo com a exposição ao HCV e de desenvolvimento de inibidor

Visto que houve um perfil diferenciado da frequência de altos produtores de citocinas e quimiocinas nos grupos estudados (soronegativos e com exposição ao HCV e com desenvolvimento ou não de inibidor) era importante verificar a relação entre esses biomarcadores em cada grupo. Para isso foi feita análise de correlação entre cada biomarcador (Figura 20).



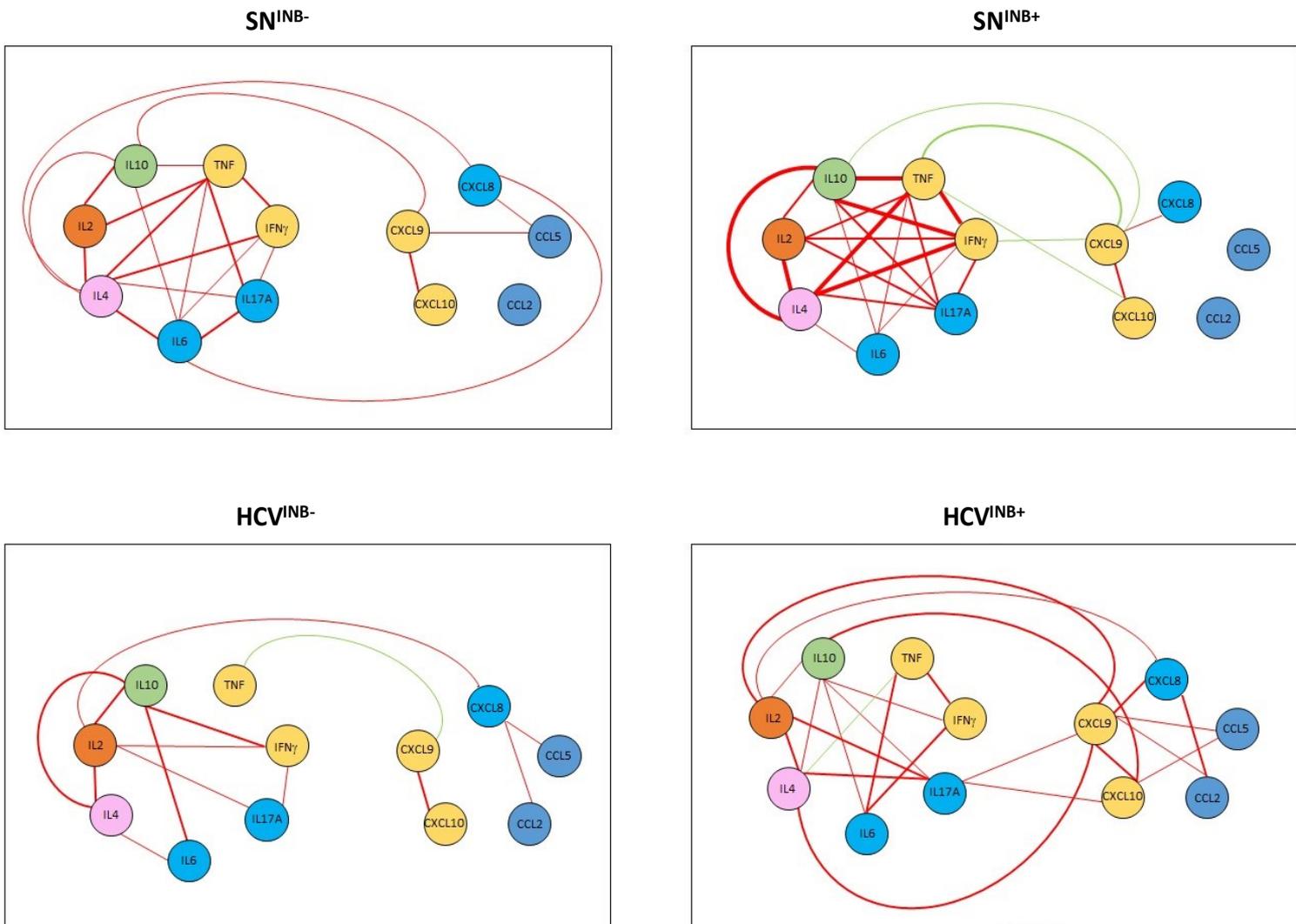
**Figura 20: Matriz de correlação de Spearman entre as concentrações das citocinas e quimiocinas em amostras de plasma de pacientes com hemofilia A soronegativos ou com exposição ao HCV (Grupo HCV, infecção passada ou presente).** Os resultados à direita da matriz (cinza) estão relacionados aos pacientes sem registro de inibidor e do lado esquerdo da matriz (lilás) àqueles com história de desenvolvimento de inibidor. As intensidades das correlações positivas foram representadas gradativamente pela cor laranja e das correlações negativas pela cor verde. São apresentados apenas os valores de r de correlação com significância estatística ( $p < 0,05$ ).

Entre os pacientes soronegativos e com desenvolvimento de inibidor (SN<sup>INB+</sup>) observou-se correlação positiva significativa entre a maioria das citocinas, sendo esta correlação forte para: INF- $\gamma$  e IL-4, IL-10, IL-17A e TNF; TNF e IL-4, IL-10; IL-2 e IL-4; e IL-10 e IL-4. Apenas neste grupo de pacientes observou-se correlação negativa (fraca ou moderada) entre quimiocinas e citocinas: CXCL9 e IL-10, TNF e INF- $\gamma$ ; CXCL10 e TNF (Figura 20). Já no grupo de pacientes soronegativos e sem desenvolvimento de inibidor (SN<sup>INB-</sup>) também houve muitas correlações positivas significativas entre as citocinas, porém numa intensidade moderada a fraca: CXCL8 e IL-4, IL-6 e CCL5; CXCL9 e IL-10, CCL5 e CXCL10 (Figura 20). Nos pacientes soronegativos, destacou-se a correlação positiva entre IL-4 e todas as outras citocinas analisadas, sejam os indivíduos com história ou não de desenvolvimento de inibidor.

Em relação aos pacientes com exposição ao HCV, aqueles com história de desenvolvimento de inibidor (HCV<sup>INB+</sup>) mostraram correlação positiva (fraca e moderada) entre várias citocinas, exceto pela correlação negativa entre TNF e IL-4, mas também entre quimiocinas e citocinas, diferentemente do grupo SN<sup>INB+</sup>. Destaca-se as várias correlações positivas significativas de CXCL9 e também de CXCL10 com outras citocinas e quimiocinas. Já no grupo HCV<sup>INB-</sup>, há menos correlações entre as citocinas e entre quimiocinas e citocinas que o observado nos indivíduos com inibidor. Não foi observada correlação forte nos grupos de pacientes com HCV (Figura 20).

Um estudo prévio comparou níveis de citocinas e quimiocinas em pacientes com hemofilia A com ou sem infecção crônica pelo HCV, e também com controles sem hemofilia e com ou sem infecção (PIMENTEL *et al.*, 2013). Os autores descreveram que a infecção crônica pelo HCV induziu a um estado geral pro-inflamatório caracterizado por altos produtores de IL-6, IL-12, CXCL8, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e modulado por IL-10 nos pacientes sem hemofilia, enquanto que os pacientes com hemofilia A infectados pelo HCV foram caracterizados por apresentarem alta produção de IL-6 e uma condição regulatória mediada por IL-4 e IL-10. Neste estudo, porém, não foi averiguado se os pacientes com hemofilia tinham ou não formação de inibidor. No presente trabalho, observou-se que as concentrações plasmáticas das citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-4 variaram dependendo do *status* de infecção pelo HCV e da história de formação de inibidor. IL-4 mostrou correlação significativa positiva com todas as outras citocinas analisadas no grupo sem infecção pelo HCV, a qual foi mais forte nos pacientes com inibidor (Figura 20). Já nos pacientes com exposição ao HCV, não houve correlação significativa de IL-4 com IFN- $\gamma$ , e houve correlação negativa de IL-4 com TNF apenas nos pacientes com inibidor (Figura 20).

Baseado na análise de correlação, foi feita a rede de interação entre os biomarcadores para cada grupo de pacientes estudados a fim de facilitar a observação geral desses resultados. Observou-se um perfil diferenciado de interação entre os quatro grupos de pacientes estudados (Figura 21). Portanto, a interação entre os biomarcadores parece ser diferencialmente modulada quando se tem mutuamente a resposta à infecção viral e de formação de inibidor.



**Figura 21: Rede de interação entre citocinas e quimiocinas em grupos de pacientes com hemofilia A.** Correlações entre concentrações plasmáticas dos biomarcadores são mostradas nos grupos de pacientes soronegativos e sem ou com história de desenvolvimento de inibidor ( $SN^{INB-}$  e  $INB^{+}$ , respectivamente), e em pacientes com exposição ao HCV e sem ou com história de desenvolvimento de inibidor ( $HCV^{INB-}$  e  $HCV^{INB+}$ , respectivamente). Correlações com significância estatística (Teste de Spearman) positivas são mostradas em vermelho e negativas em verde. As intensidades das correlações são representadas pela espessura da linha: mais grossa, correlação forte; média, correlação moderada; fina, correlação fraca. As cores indicam biomarcadores associados principalmente à resposta Th1 (amarela), Th2 (rosa), Treg (verde), Th17 (azul claro) e de amplo espectro (laranja e azul escuro).

O grupo soronegativo e sem história de desenvolvimento de inibidor ( $SN^{INB^-}$ ), caracterizado por ter uma resposta tipo Th2, mostrou interação entre os biomarcadores das respostas Th1, Th2, Th17 e anti-inflamatória (Figura 21).

Por outro lado, no outro grupo sem inibidor e com exposição ao HCV ( $HCV^{INB^-}$ ), caracterizado por uma resposta imune negativamente modulada, houve claramente menos interação entre as citocinas. Caracteristicamente, não houve uma interação entre os biomarcadores de resposta Th1 (TNF e  $IFN-\gamma$ ) e Th2 (IL-4). Este grupo apresentou alta frequência de altos produtores de CXCL8 e CCL2, cujos níveis se correlacionaram entre eles, o que também aconteceu no grupo  $HCV^{INB^+}$ , mas não nos grupos sem infecção. A correlação positiva entre CXCL8 e IL-2 também só foi observada nos grupos HCV (Figura 21).

Nos grupos com inibidores, esta interação entre os diferentes tipos de resposta se intensifica, especialmente no grupo  $SN^{INB^+}$ . Neste grupo, com altos produtores de TNF e  $IFN\gamma$ , há uma correlação negativa entre estas citocinas e as quimiocinas CXCL9 e CXCL10, o que sugere que não está havendo migração de linfócitos Th1 estimulados para um foco inflamatório. Um contrabalanço dessa resposta Th1 periférica parece ser feita por IL-10 (resposta anti-inflamatória) e IL-4 (resposta Th2). No grupo  $HCV^{INB^+}$ , os marcadores de resposta Th2 (IL-4), Treg (IL-10) e Th17 (IL-6), além de IL-2, fazem interação com a rede de quimiocinas, mas não os marcadores de resposta Th1.

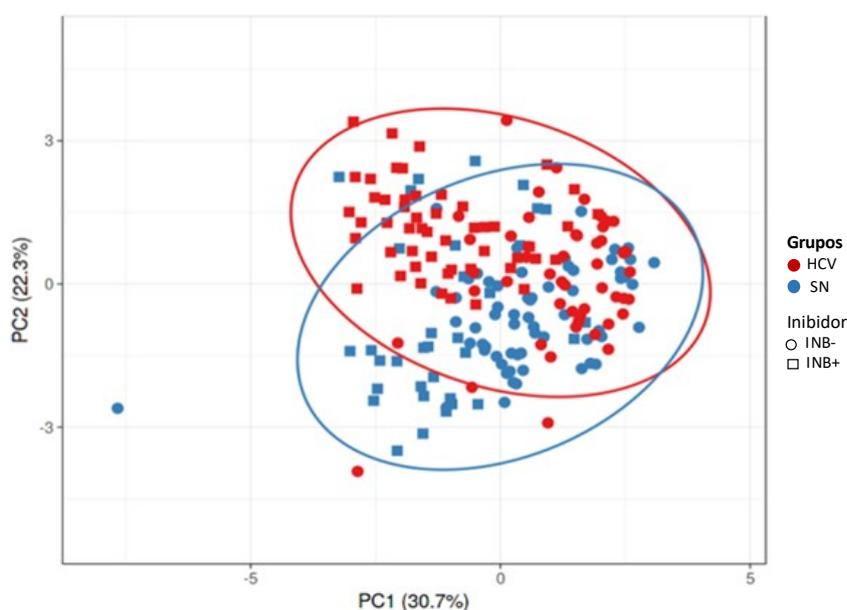
A rede de interações novamente sugere que enquanto os níveis de citocinas parecem ser influenciados por ambas as respostas de formação de inibidor e de combate da infecção antiviral, os níveis de quimiocinas parecem refletir principalmente a condição de infecção ao HCV.

## **5.6 Análise de componente principal (PCA) e de *Heatmap* nos pacientes com hemofilia A classificados de acordo com a exposição ao HCV e de desenvolvimento de inibidor**

Para melhor caracterizar a resposta imunológica pelo microambiente de citocinas e quimiocinas plasmáticas nos pacientes com história ou não de desenvolvimento de inibidor e de exposição ao HCV, foi feita análise multivariada dos biomarcadores, usando análise de componente principal, do inglês *principal component analysis* (PCA) e *Heatmap*, a fim de avaliar os possíveis agrupamentos de indivíduos de acordo com os níveis plasmáticos dos biomarcadores. A análise de componente principal permite reduzir os dados principais (concentração dos

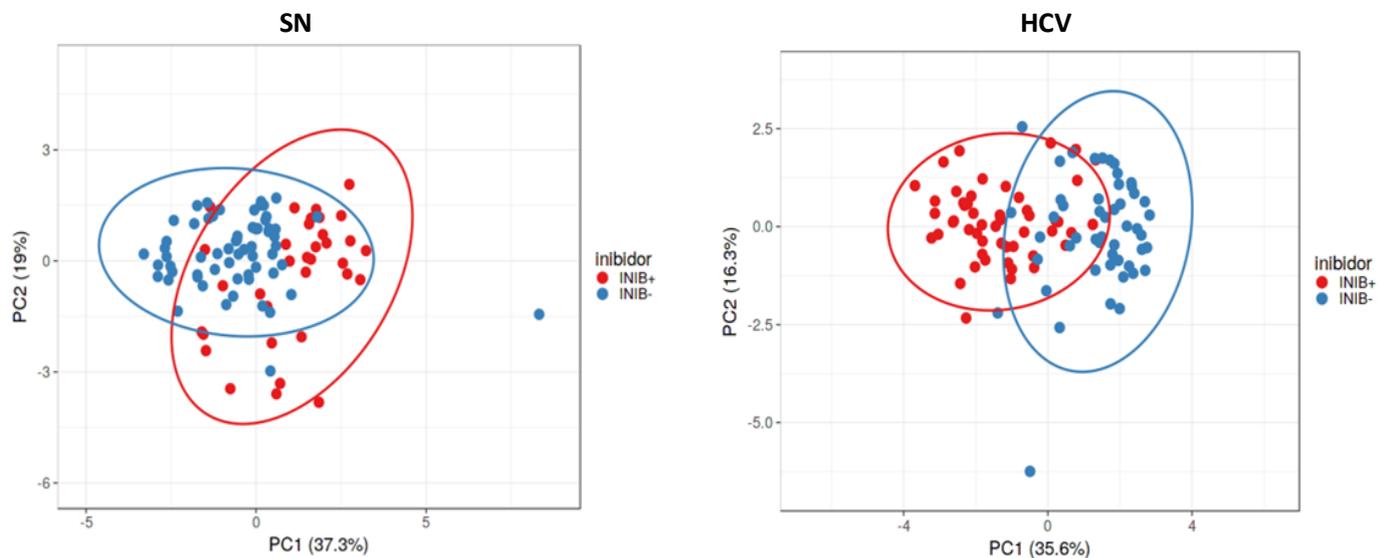
biomarcadores) em um conjunto de dados multidimensional sem a introdução de viés. Os eixos são representados por componentes principais PC1 e PC2 que são responsáveis por explicar o modelo de forma mais eficiente, ou seja, quanto mais elevada essa porcentagem mais esse modelo pode ser explicado pelas variáveis introduzidas no modelo. Portanto, a análise PCA buscou o agrupamento dos pacientes com hemofilia A pelo conjunto das concentrações plasmáticas de citocinas e quimiocinas dosadas, e pelo *status* quanto à exposição ao HCV e de desenvolvimento de inibidor.

A primeira análise PCA mostrou que os agrupamentos dos pacientes com HCV e SN foram em parte distintos, e que, portanto, não só a história de desenvolvimento de inibidor, mas também a infecção pelo HCV, podem influenciar nas concentrações plasmáticas destes biomarcadores de resposta imunológica (Figura 22). Além disso, na região não sobreposta dos grupos observa-se principalmente pacientes com história de desenvolvimento de inibidor, representado na figura pelos quadrados. Isto está de acordo com a observação de que diferenças significativas nas concentrações dos biomarcadores foram mais frequentes na comparação dos grupos com inibidores ( $SN^{INB+}$  vs.  $HCV^{INB+}$ ) do que dos grupos sem inibidores ( $SN^{INB-}$  vs.  $HCV^{INB-}$ ) (Tabelas 8 e 7, respectivamente).



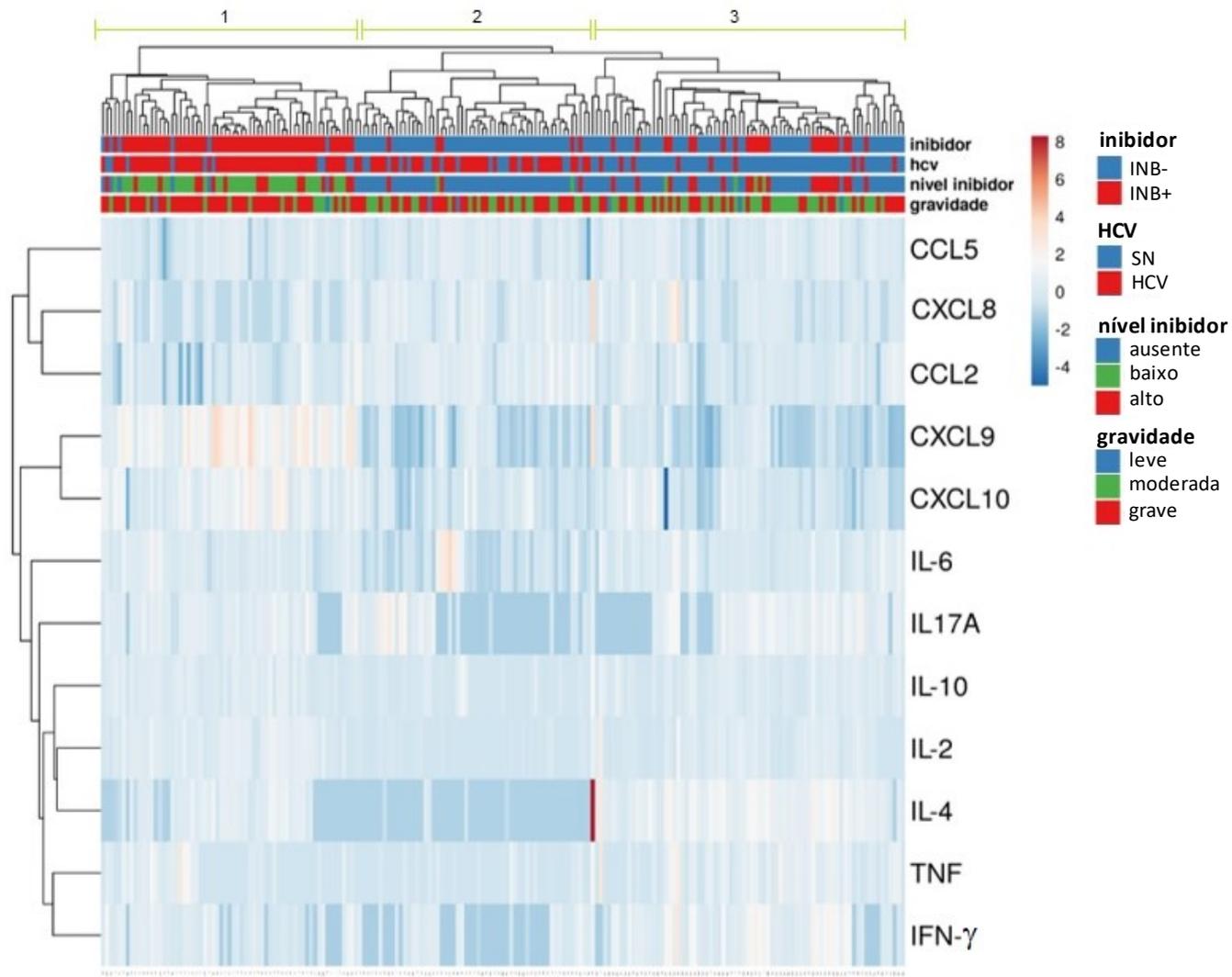
**Figura 22:** Análise de componentes principais para a concentração plasmática de citocinas e quimiocinas em pacientes com hemofilia A com ou sem exposição ao HCV (HCV e SN, respectivamente) apresentando ou não histórico de desenvolvimento de inibidor (INB+ e INB-, respectivamente). As áreas das elipses indicam, com probabilidade de 95%, a previsão de que uma nova observação do mesmo grupo se enquadrará dentro da elipse.

Para compreender melhor o efeito da infecção pelo HCV na resposta de desenvolvimento de inibidor, considerando a modulação dos níveis de quimiocinas e citocinas plasmáticas, foi feita uma Análise de Componentes Principais separada para os pacientes de acordo com o *status* de exposição ao HCV (Figura 23). Os resultados mostraram que os pacientes com exposição ao HCV apresentaram maior diferenciação de agrupamento quanto à história de desenvolvimento ou não de inibidor, quando comparado com o grupo que não tem infecção, indicando que o HCV influencia na modulação dos biomarcadores e interfere na resposta de desenvolvimento de inibidor.



**Figura 23: Análise de Componentes Principais para a concentração plasmática de citocinas e quimiocinas em pacientes com hemofilia A com ou sem histórico de desenvolvimento de inibidor (INB- e INB+, respectivamente).** Foram analisados separadamente os grupos de pacientes com exposição ao HCV (HCV) ou não (SN). As elipses indicam, com probabilidade de 95%, a previsão de que uma nova observação do mesmo grupo se enquadrará dentro da elipse.

Em seguida, foi feita a análise *Heatmap*, que é uma matriz de dados que fornece a visualização dos valores nas células através de um gradiente de cor. Dessa forma, é possível obter uma visão geral do conjunto de dados e dos maiores e menores valores da matriz. Assim, neste estudo as linhas e colunas da matriz foram agrupadas pela ferramenta, indicando o agrupamento dos indivíduos pelo conjunto das concentrações dos biomarcadores (Figura 24).



**Figura 24: Heatmap das concentrações plasmáticas de citocinas e quimiocinas em pacientes com hemofilia A.** A transformação logarítmica  $[\log(x+1)]$  foi aplicada aos dados originais. Os agrupamentos foram formados com base na correlação de Pearson, utilizando o método de agrupamento de ligação média (average linkage). Para identificar os diferentes subgrupos, são representados na horizontal pacientes categorizados de acordo com as seguintes características: sem ou com histórico de desenvolvimento de inibidor (INB- e INB+, respectivamente), sem ou com exposição ao HCV (SN e HCV, respectivamente), com níveis de inibidor ausente, baixo ou alto, e hemofilia leve, moderada ou grave. As linhas horizontais no topo da figura identificam os três principais agrupamentos representados.

Essa análise multivariada das concentrações plasmáticas de citocinas e quimiocinas nos pacientes com hemofilia evidenciou o agrupamento de três principais perfis de grupos de indivíduos, caracterizados como: perfil 1 - pacientes com exposição ao HCV e de desenvolvimento de inibidor ( $HCV^{INB+}$ ), em baixos níveis, com maior concentração de CXCL9 e CXCL10 e níveis médios a baixos de IL-4 e de  $IFN\gamma$ ; perfil 2 - pacientes com exposição ao HCV mas sem desenvolvimento de inibidor, com baixas concentrações de CXCL9 e  $IFN\gamma$ ,

média concentração de CXCL10, e com os menores níveis de IL-4 (HCV<sup>INB-</sup>); e perfil 3 - pacientes soronegativos e com história ou não de desenvolvimento de inibidor (SN<sup>INB-/INB+</sup>), com concentrações baixas de CXCL9 e de CXCL10, e níveis mais altos de IL-4, TNF e IFN $\gamma$ . A característica de ter baixos níveis de inibidor foi claramente agrupada no perfil 1, enquanto a classificação quanto à gravidade da hemofilia não mostrou nenhum agrupamento associado ao conjunto das concentrações plasmáticas destas citocinas e quimiocinas analisadas, embora os pacientes do perfil 1 apresentavam na sua maioria a doença grave.

O conjunto de resultados do presente trabalho aponta para uma interferência da resposta à infecção pelo HCV na resposta de formação de inibidor, e isso ficou melhor evidenciado com essas análises de agrupamento. A análise PCA mostrou que as concentrações plasmáticas das citocinas e quimiocinas analisadas determinou um agrupamento mais diferenciado dos pacientes com exposição ao HCV sem ou com história de desenvolvimento de inibidor, o que não foi tão evidente nos soronegativos (Figura 23). A análise *Heatmap* definiu três principais grupos caracterizados pelas concentrações altas, médias ou baixas das citocinas e quimiocinas, e novamente houve um agrupamento distinto dos pacientes com HCV e sem inibidor (HCV<sup>INB-</sup>) ou com inibidor (HCV<sup>INB+</sup>), enquanto que os pacientes sem infecção mostraram um perfil mais homogêneo, sendo agrupados num único bloco independente da história de desenvolvimento ou não de inibidor (SN<sup>INB-/INB+</sup>). Essa análise também evidenciou a associação de baixos níveis de inibidores com os pacientes com infecção pelo HCV. Os grupos HCV foram caracterizados pelas baixas concentrações de IL-4 no sangue periférico, mas por uma alta produção de quimiocinas que podem sugerir uma resposta inflamatória localizada. Pode-se hipotetizar que a infecção pelo HCV dispara uma resposta inflamatória tipo Th1 que pode favorecer a resposta primária de formação de inibidor, o que justifica a associação independente entre exposição ao HCV e história de formação de inibidor observada em pacientes desta coorte (MARTINS *et al.*, 2020). Por outro lado, a infecção viral parece diminuir a resposta Th2, caracterizada pela produção de IL-4, que é considerada importante para manter uma forte resposta de formação de inibidor (HU *et al.*, 2007). Isto está de acordo com a forte associação observada entre exposição ao HCV e baixos níveis de inibidor (OD=16,97, p<0,001, Tabela 3). Esse trabalho tem suas limitações, tais como: os dados de exposição ao HCV e de formação de inibidor são retrospectivos e a análise de prontuários não permite determinar se a infecção pelo HCV ocorreu antes ou depois da formação de inibidor. Além disso, a maioria dos pacientes com anti-HCV reativo também tinham outros marcadores de infecções transmitidas por transfusão. Porém, este estudo analisou um número expressivo de amostras de pacientes com

hemofilia A em comparação à maioria dos estudos que vem sendo publicados com esta mesma população de estudo. Os resultados abrem novas perspectivas para futuros estudos nessa população de pacientes com hemofilia em busca de estabelecer um modelo para melhor explicar a imunomodulação entre a infecção viral e a formação de inibidores, que pode impactar no desfecho clínico da hemofilia.

## 6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que:

- Idade mais avançada, maior frequência de uso de crioprecipitado e de plasma fresco congelado, hemofilia grave, história de desenvolvimento de inibidor, níveis mais baixos de inibidor e mais comorbidades foram significativamente associadas à exposição ao HCV nos pacientes com hemofilia A. Entretanto, a utilização exclusiva de hemoderivados foi um fator de proteção contra a aquisição da infecção pelo HCV.
- A taxa de cura espontânea para HCV foi de 30% nos pacientes com hemofilia A, dentro da faixa de proporção que é observada em outras populações sem hemofilia. A taxa de 60,6% de pacientes com infecção crônica sem alteração hepática também está dentro do observado para outras populações sem a doença genética.
- O perfil de concentrações de citocinas e quimiocinas variou entre os grupos dependendo da história de desenvolvimento de inibidor e de exposição ao HCV.
- Maiores níveis plasmáticos de citocinas foram associados com a história de desenvolvimento de inibidor, enquanto que maiores níveis de quimiocinas foram associados com a exposição ao HCV.
- Os principais biomarcadores de resposta de formação de inibidor foram as citocinas IL-4 e IFN- $\gamma$ , e de resposta à infecção pelo HCV foram as quimiocinas CXCL9 e CXCL10.
- A resposta à infecção pelo HCV pode modular a resposta imune gerada na formação de inibidores. Pelos resultados do estudo, pode ser sugerido que a infecção pelo HCV desencadeia uma resposta Th1 que favorece a resposta primária de formação de inibidor. Isso explica porque o HCV foi um fator associado à história de desenvolvimento de inibidor. Ao mesmo tempo, a exposição ao vírus diminui a resposta Th2, que é importante na manutenção da resposta de formação de inibidores e de manutenção da produção dos anticorpos anti-FVIII em altos níveis. Isto está de acordo com a observação de forte associação entre exposição ao HCV e baixos níveis de inibidores.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTER, M.J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. **World J Gastroenterol**, v.13, n. 17, p. 2436-2441, Mai. 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4146761/pdf/WJG-13-2436.pdf>. Acesso em: 02 Fev. 2020.

ANGELINI, D., KONKLE, B.A., SOOD, S.L. Aging among persons with hemophilia: contemporary concerns. **Semin Hematol**, v.53, n.1, p.35-9, Jan 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0037196315000827?via%3Dihub>. Acesso em: 29 Mar. 2020.

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.; LILICRAP, 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: A: Results of an International Consortium Study. **Blood**, v.86, p.2206–2212, Set. 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7662970-factor-viii-gene-inversions-in-severe-hemophilia-a-results-of-an-international-consortium-study/>. Acesso em: 02 Fev. 2020.

ANTONELLI, A.; FERRARI, S.M.; RUFFILLI, I.; FALLAHI, P. Cytokines and HCV-related autoimmune disorders. **Immunol Res** v.60, n. 2-3, p.311–319, Dez 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12026-014-8569-1>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

ANTONELLI, A.; FERRI, C.; GALEAZZI, M.; GIANNITTI, C.; MANNO, D.; MIELI-VERGANI, G.; MENEGATTI, E.; OLIVIERI, I.; PUOTI, M.; PALAZZI, C.; ROCCATELLO, D.; VERGANI, D.; SARZI-PUTTINI, P.; ATZENI, F. HCV infection: pathogenesis, clinical manifestations and therapy. **Clin Exp Rheumatol**. v. 26, n. 48, S.39–47. Jan-Feb. 2008. Disponível em: <https://www.clinexprheumatol.org/article.asp?a=3300>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

ASTERMARK, J.; OLDENBURG, J.; PAVLOVA, A.; BERNTORP, E.; LEFVERT, A.K.; MIBS STUDY GROUP. 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, Abr 2006a. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16380445>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

ASTERMARK, J. Why do inhibitors develop? Principles of and factors influencing the risk for inhibitor development in haemophilia. **Haemophilia**, v.12 p.52–60, Abr. 2006. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2516.2006.01261.x> Acesso em: 02 Fev. 2020.

BARTENSCHLAGER, R.; LOHMANN, V.; PENIN, F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. **Nat Rev Microbiol**, 11, n. 7, p. 482-496, Jul. 2013. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro3046>. Acesso em: 02 Fev. 2020.

BELLANTI, F.; VENDEMIALE, G.; ALTOMARE, E.; SERVIDDIO, G. The impact of interferon lambda 3 gene polymorphism on natural course and treatment of hepatitis C. **Clin Dev Immunol**. 2012; 2012: 849373. Ago 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3433716/>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

BENOVA, L.; MOHAMOUD, Y.A.; CALVERT, C.; ABU-RADDAD, L.J. Vertical transmission of hepatitis C virus: systematic review and meta-analysis. **Clin Infect Dis**, v. 59, n. 6, p. 765-773, Set. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4144266/pdf/ciu447.pdf>. Acesso em: 02 Fev. 2020.

BERNARDINI, A.P. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v.38, n. 1, p.41-49, Jan. 2005. Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-879X2005000100007&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2005000100007&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 02 Fev. 2020.

BLANCHETTE, V.S.; KEY, N.S.; LJUNG, L.R.; MANCO-JOHNSON, M.J.; VAN DEN BERG, H.M.; SRIVASTAVA, A.; SUBCOMMITTEE ON FACTOR VIII, FACTOR IX AND RARE COAGULATION DISORDERS OF THE SCIENTIFIC AND STANDARDIZATION COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL SOCIETY ON THROMBOSIS AND HEMOSTASIS. Definitions in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. **J Thromb Haemost**, v.12, n. 11, p. 1935-1939, Nov. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jth.12672>. Acesso em: 02 Fev. 2020.

BLINDENBACHER, A., WANG, X.; LANGER, I.; SAVINO, R.; TERRACCIANO, L.; HEIM, M.H. Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice. **Hepatology**, vol. 38, n.3, p. 674-682. Set 2003. Disponível em: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1053/jhep.2003.50378>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

BODE, J.G.; LUDWIG, S.; EHRHARDT, C.; ALBRECHT, U.; ERHARDT, A.; SCHAPER, F.; HEINRICH, P.C.; HÄUSSINGER, D. IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. **FASEB J.** v.17, n.3, p. 488-490, Mar 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12551851-ifn-alpha-antagonistic-activity-of-hcv-core-protein-involves-induction-of-suppressor-of-cytokine-signaling-3/>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

BRASIL. **ABCDE do diagnóstico para as hepatites virais**. DEPARTAMENTO DE DST e VIRALIS, A. E. H. Brasília: Ministério da Saúde 2009. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/ABCDE\\_diagnostico\\_hepatites\\_virais.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/ABCDE_diagnostico_hepatites_virais.pdf). Acesso em: 02 Fev. 2020.

BRASIL. **Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais**. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA, P.E.C.D.I., DO HIV/AIDS E DAS HEPATITES e (DIAHV), V. Brasília 2019. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2019/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2019>. Acesso em: 02 Fev. 2020.

BRASIL. **Hemofilia congênita e inibidor: manual de diagnóstico e tratamento de eventos hemorrágicos**. ESPECIALIZADA., D. D. A. Brasília: Ministério da Saúde 2009b. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/hemofilia\\_congenita\\_inibidor\\_diagnostico\\_tratamento.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/hemofilia_congenita_inibidor_diagnostico_tratamento.pdf). Acesso em: 02 Fev. 2020.

BRASIL. **Manual de hemofilia**. TEMÁTICA, D.D.A.E.E. Brasília: Ministério da Saúde. 2015a. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_hemofilia\\_2ed.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_hemofilia_2ed.pdf). Acesso em: 02 Fev. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Portaria nº 1.376, de 19 de novembro de 1993**. Aprova as alterações da Portaria nº 721/GM, de 9/8/89, que aprova as normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados, e dá outras providências. Brasília, Diário Oficial da União, p. 18404, 2 de dezembro de 1993.

BRASIL. **O Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais**. DEPARTAMENTO DE DST, A. E. H. V. Brasília: Ministério da Saúde 2018b. Disponível em: [file:///C:/Users/eduar/Downloads/manual\\_tecnico\\_hepatites\\_virais\\_web\\_310818.pdf](file:///C:/Users/eduar/Downloads/manual_tecnico_hepatites_virais_web_310818.pdf). Acesso em: 02 Fev. 2020.

BRASIL. **Perfil das coagulopatias hereditárias no Brasil**:2015. E, D. D. A. E. e TEMÁTICA. Brasília: Ministério da Saúde 2017b. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/perfil\\_coagulopatias\\_hereditarias\\_brasil\\_2015.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/perfil_coagulopatias_hereditarias_brasil_2015.pdf). Acesso em: 02 Fev. 2020.

BRASIL. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções**. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA, P. E. C. D. I. S. T., DO HIV/AIDS E DAS HEPATITES VIRALIS. Brasília: Ministério da Saúde 2017c. Disponível em: [http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2018/Relatorio\\_PCDT\\_HepatiteC.pdf](http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2018/Relatorio_PCDT_HepatiteC.pdf). Acesso em: 02 Fev. 2020.

BRACKMANN, H.-H.; WHITE, C.G.; BERNTORP, E.; ANDERSEN, T.; ESCURIOLA-ETTINGSHAUSEN, C. Immune tolerance induction: What have we learned over time? **Haemophilia**, v. 24, p. 3–14, Jan. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23157203> Acesso em: 02 Fev. 2020

BRASS A.; BRENNDÖRFER E.D. The Role of Chemokines in Hepatitis C Virus-Mediated Liver Disease. **Int. J. Mol. Sci.**, v.15, p. 4747-4779, Mar. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3975423/pdf/ijms-15-04747.pdf>. Acesso em: 02 Fev. 2020.

CAMPIOTTO, S.; PINHO, J.R.R.; CARRILHO, F.J.; DA SILVA, L.C.; SOUTO, F.J.D.; SPINELLI, V.; PEREIRA, L.M.M.B.; COELHO, H.S.M.; SILVA, A.O.; FONSECA, J.C.; ROSA, H.; LACET, C.M.C.;

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, n.1, p.59-65, Jan. 2011. Disponível em: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1160/TH10-04-0231>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

CARMO, R.A.; OLIVEIRA, G.C.; GUIMARÃES, M.D.; OLIVEIRA, M.S.; LIMA, A.A.; BUZEK, S.C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; ROCHA, M.O.C. Hepatitis C virus infection among Brazilian hemophiliacs: a virological, clinical and epidemiological study. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, n. 5, p. 589-598, Mai. 2002. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-879X2002000500012&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2002000500012&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 02 Fev. 2020.

CARMO, R.A.; MARTINS, M.L.; CHAVES, D.G.; DEZANET, L.N.C. Prevalence and risk factors associated with hepatitis C among Brazilian male patients with haemophilia: A long-term follow-up. **Haemophilia**, v. 25, n. 3, p. 447-455, Mai. 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/hae.13728>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

CARSON, W.F.; KUNKEL, S.L. Regulation of Cellular Immune Responses in Sepsis by Histone Modifications. **Adv Protein Chem Struct Biol**, v. 106, p.191-225, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876162316300487?via%3Dihub>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

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 J Hematol Blood Transfus**, v. 30, n. 1, p. 1-11, Mar. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3921319/>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

CHANG, K. M. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. **Clin Liver Dis**, v. 7, n. 1, p. 89-105, Feb 2003. Disponível em: [https://www.liver.theclinics.com/article/S1089-3261\(02\)00068-5/fulltext](https://www.liver.theclinics.com/article/S1089-3261(02)00068-5/fulltext). Acesso em: 08 Fev. 2020.

CHAVES, D.G.; VELLOSO-RODRIGUES, C; MOREAU, V.; NGUYEN, C.; VILLARD, S.; BELISÁRIO, A.R.; GRANIER, C.; SANTORO, M.M. 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. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2141.2008.07043.x>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

CIPITELLI, M. C. **Efeito das quimiocinas na alteração da permeabilidade de células endoteliais na dengue**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2014, Rio de Janeiro, 2014.

COLLINS, P.W.; CHALMERS, E.; HART, D.P.; LIESNER, R.; RANGARAJAN, S.; TALKS, K.; WILLIAMS, M.; HAY, C.R.; UK HAEMOPHILIA CENTRE DOCTORS. Diagnosis and treatment of factor VIII and IX inhibitors in congenital haemophilia: (4th edition). UK Haemophilia Centre Doctors Organization. **Br J Haematol**, v.160, n.2, p. 153-170. Jan. 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/bjh.12091>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

COPPOLA, A.; FRANCHINI, M.; CASTAMAN, G.; SANTAGOSTINO, E.; SANTORO, C.; SANTORO, R.; MORFINI, M.; DI MINNO, G.; ROCINO, A. ON BEHALF OF THE AICE AD HOC WORKING GROUP. Treatment Regimens with Bypassing Agents in Patients with Hemophilia A and Inhibitors: A Survey from the Italian Association of Hemophilia Centers (AICE). **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v.44, p.551-560, 2018. Disponível em: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0038-1648230>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

CRUVINEL, W.M.; MESQUITA, D.; ARAÚJO, J.A.; CATELAN, T.T.; DE SOUZA, A.W.; DA SILVA, N.P.; ANDRADE, L.E. Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Rev Bras Reumatol**, v.50, n. 4, p. 434-461, Jul-Ago 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21125178-immune-system-part-i-fundamentals-of-innate-immunity-with-emphasis-on-molecular-and-cellular-mechanisms-of-inflammatory-response/>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

CZEPIEL, J.; BIESIADA, G.; MACH, T. Viral hepatitis C. **Pol Arch Med Wewn**, v. 118, n. 12, p. 734-40, Dec. 2008. Disponível em: <https://www.mp.pl/paim/en/node/542/pdf>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

DEKOVEN, M.; WISNIEWSKI, T.; PETRILLA, A.; HOLOT, N.; LEE, W.C.; COOPER, D.L.; VON MACKENSEN, S. Health-related quality of life in haemophilia patients with inhibitors and their caregivers. **Haemophilia**, v.19, n. 2, p. 287-293, Set. 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/hae.12019>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

DIMICHELE, D.M. Inhibitors in haemophilia: A primer. **Haemophilia**, v.6, p.38-40, Jul. 2000. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-2516.2000.00045.x>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

DODD, R.; KURT ROTH, W.; ASHFORD, P.; DAX, E.M.; VYAS, G. Transfusion medicine and safety. **Biologicals**, v. 37, n. 2, p. 62-70, Abr 2009. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/24028560\\_Transfusion\\_medicine\\_and\\_safety](https://www.researchgate.net/publication/24028560_Transfusion_medicine_and_safety). Acesso em: 08 Fev. 2020.

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.594-598, Mar. 1992. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PII0140-6736\(92\)90874-3/fulltext#%20](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PII0140-6736(92)90874-3/fulltext#%20). Acesso em: 08 Fev. 2020.

EL KHOURI, M.; CORDEIRO, Q.; LUZ, D. A.; DUARTE, L. S. Gama, M.E. A.; Corbett, C. E. P. Endemic hepatitis b and c virus infection in a brazilian eastern amazon region. **Arq. Gastroenterol.**, São Paulo , v. 47,n. 1,p. 35-41, Mar.2010. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-28032010000100007&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-28032010000100007&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 08 Fev. 2020.

FERRARI, S.M.; FALLAHI, P.; RUFFILLI, I.; ELIA, G.; RAGUSA, F.; PAPARO, S.R.; PATRIZIO, A.; MAZZI, V.; COLACI, M.; GIUGGIOLI, D.; FERRI,C.; ANTONELLI, A. Immunomodulation of CXCL10 Secretion by Hepatitis C Virus: Could CXCL10 Be a Prognostic Marker of Chronic Hepatitis C? **Journal of Immunology Research**, v.2019, Article ID 5878960, Ago. 2008. Disponível em: <http://downloads.hindawi.com/journals/jir/2019/5878960.pdf> Acesso em: 10 Fev. 2020.

FERREIRA, A.A.; LEITE, I.C.; BUSTAMANTE-TEIXEIRA, M.T.; GUERRA, M.R. Hemophilia A in Brazil - epidemiology and treatment developments. **J Blood Med**, v. 5, p. 175-184, 2014, Set 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4183441/>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

FERRI, C.; ANTONELLI, A.; MASCIA, M.T.; SEBASTIANI, M.; FALLAHI, P.; FERRARI, D.; GIUNTI, M.; PILERI, S.A.; ZIGNEGO, A.L. HCV-related autoimmune and neoplastic disorders: the HCV syndrome. **Dig Liver Dis**. v.39, p. S13-21, Set 2007a. Disponível em: [https://www.dldjournalonline.com/article/S1590-8658\(07\)80005-3/pdf](https://www.dldjournalonline.com/article/S1590-8658(07)80005-3/pdf). Acesso em: 10 Fev. 2020.

FERRI, C.; ANTONELLI, A.; MASCIA, M.T.; SEBASTIANI, M.; FALLAHI, P.; FERRARI, D.; GIUNTI, M.; PILERI, S.A.; ZIGNEGO, A.L. Bcells and mixed cryoglobulinemia. **Autoimmun Rev**. v.7, n.2, p. 114-120, Dez. 2007b. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1568997207000602>. Acesso em: 10 Fev. 2020.

FOCACCIA, R.; DA CONCEIÇÃO OJ; SETTE, H.; SABINO, E. BASSIT, L.; NITRINI D.R.; LOMAR, A.V.; LORENÇO, R.; VIEIRA DE SOUZA, F.; KIFFER, C.R.; SANTOS, E.B.; GONZALES, M.P.; SÁEZ-ALQUÉZAR, A. RISCAL, J.R.; FISCHER, D. Estimated Prevalence of Viral Hepatitis in the General Population of the Municipality of São Paulo, Measured by a Serologic Survey of a Stratified, Randomized and Residence-Based Population. **Braz J Infect Dis**, v. 2, n. 6, p. 269-284, Dez. 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11103019-estimated-prevalence-of-viral-hepatitis-in-the-general-population-of-the-municipality-of-sao-paulo-measured-by-a-serologic-survey-of-a-stratified-randomized-and-residence-based-population/>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

GARAGIOLA, I.; PALLA, R.; PEYVANDI, F. Risk factors for inhibitor development in severe hemophilia A. **Thrombosis Research**, v. 168, p. 20–27, Mai 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29879570>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

GE, D.; FELLAY, J.; THOMPSON, A.J.; SIMON, J.S.; SHIANNNA, K.V.; URBAN, T.J.; HEINZEN, E.L.; QIU, P.; BERTELSEN, A.H.; MUIR, A.J.; SULKOWSKI, M.; MCHUTCHISON, J.G.; GOLDSTEIN, D.B. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. **Nature**, v. 461, n. 7262, p. 399-401, Set. 2009. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature08309>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

GIBB, D. M.; GOODALL, R. L.; DUNN, D. T.; HEALY, M.; NEAVE, P.; CAFFERKEY, M.; BUTLER, K. Mother-to-child transmission of hepatitis C virus: evidence for preventable peripartum transmission. **Lancet**, v. 356, n. 9233, p. 904-907, Set 2000. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(00\)02681-7/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(00)02681-7/fulltext). Acesso em: 08 Fev. 2020.

GOUW, S.C.; VAN DER BOM, J.G.; MARIJKE VAN DEN BERG, H. Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study. **Blood**, v.109, n.11, p. 4648-4654, Jun. 2007. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article-lookup/doi/10.1182/blood-2006-11-056291>. Acesso em: 10 Fev. 2020.

GOWER, E.; ESTES, C.; BLACH, S.; RAZAVI-SHEARER, K.; RAZAVI, H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. **J Hepatol**, v. 61, n. 1 Suppl, p. S45-57, Nov 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25086286>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

GRINGERI, A.; MANTOVANI, L.G.; SCALONE, L.; MANNUCCI, P.M.; SCALONE, L.; MANNUCCI, P.M.; COCIS STUDY GROUP. Cost of care and quality of life for patients with hemophilia complicated by inhibitors: the COCIS Study Group. **Blood**, v. 102, n. 7, p. 2358-2363, Out. 2003. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article-lookup/doi/10.1182/blood-2003-03-0941>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

HAY, C.R.; 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, **Thromb. Haemost.** v.77, p.234–237. Fev. 1997. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9157572>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

HAY, C.R.M.; PALMER, B.; CHALMERS, E.; LIESNER, R.; MACLEAN, R.; RANGARAJAN, S.; WILLIAMS, M.; COLLINS, P.W.; UNITED KINGDOM HAEMOPHILIA CENTRE DOCTORS' ORGANISATION (UKHCDO). Incidence of factor VIII inhibitors throughout life in severe hemophilia A in the United Kingdom. **Blood**, v. 117, n. 23, p. 6367-6370, Jun. 2011. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article-lookup/doi/10.1182/blood-2010-09-308668>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

HAY, C.R.; DIMICHELE, D.M.; INTERNATIONAL IMMUNE TOLERANCE STUDY. The principal results of the International Immune Tolerance Study: A randomized dose comparison. **Blood**, v. 119, n.6, p. 1335-44, Fev. 2012. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article-lookup/doi/10.1182/blood-2011-08-369132>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

HEIM M.H.; THIMME, R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. **J Hepatol**, v. 61, S14-25, Nov 2014. Disponível em: [https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278\(14\)00465-6/pdf](https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278(14)00465-6/pdf). Acesso em: 08 Fev. 2020.

HEIM, M.H. 25 years of interferon-based treatment of chronic hepatitis C: an epoch coming to an end. **Nat Rev Immunol**, v.13, n. 7, p. 535-542, Jul. 2013. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri3463>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

HEYDTMANN, M.; ADAMS, D.H. Chemokines in the immunopathogenesis of hepatitis C infection. **Hepatology**, v. 49, n.2, p.676-688, Ago. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2919201/>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

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. **Thromb Haemost.** May; 2007, v.97, n.5, p.788-794, Mai. 2007, Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17479189>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

ITOH Y.; MORITA A.; NISHIOJI K.; NARUMI S.; TOYAMA T.; DAIMON Y.; NAKAMURA H.; KIRISHIMA T.; OKANOUE T. Clinical significance of elevated serum interferon-inducible protein-10 levels in hepatitis C virus carriers with persistently normal serum transaminase levels. **J Viral Hepat.** v. 8, n.5, p.341–348, Set. 2001. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-2893.2001.00309.x>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

KAMAL, S.M. Acute hepatitis C: a systematic review. **Am J Gastroenterol**, v. 103, n. 5, p. 1283-1297, Mai 2008. Disponível em: <https://sbdww.org/wp-content/uploads/2011/04/hepatitis-C-am-j-gastroent-2008.pdf>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

KAPLAN, D.E. Immunopathogenesis of Hepatitis C Virus Infection. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 44, n. 4, p. 735-760, Dez 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4660249/>. Acesso em: 08 Fev. 2020

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, n.2, p.612, Out.1975. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/1198543>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

KLENERMAN, P. THIMME, R. T cell responses in hepatitis C: the good, the bad and the unconventional. **Gut**. V.61, n.8, p.1226-1234, Ago 2012. Disponível em: <https://gut.bmj.com/content/61/8/1226.long>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

KREUZ, W.; ETTINGSHAUSEN, C.E.; ZYSCHKA, A.; OLDENBURG, J.; SAGUER, I.M.; EHRENFORTH, S; KLINGEBIEL, T. Inhibitor development in previously untreated patients with hemofilia A: a prospective long-term follow-up comparing plasma-derived and recombinant products. **Semin. Thromb. Hemost.** v.28, p. 285–290, Jun, 2002. Disponível em: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2002-32664>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

LANINI, S.; SCOGNAMIGLIO, P.; MECOZZI, A.; LOMBARDOZZI, L.; VULLO, V.; ANGELICO, M.; GASBARRINI, A.; TALIANI, G.; ATTILI, A.F.; PERNO, C.F.; DE SANTIS, A.; PURO, V.; CERQUA, F.; D'OFFIZI, G.; PELLICELLI, A.; ARMIGNACCO, O.; MENNINI, F.S.; SICILIANO, M.; GIRARDI, E.; PANELLA, V.; IPPOLITO, G.; MEMBERS OF THE LAZIO REGION HCV TREATMENT GROUP. Impact of new DAA therapy on real clinical practice: a multicenter region-wide cohort study. **BMC Infect Dis**, v.18, n.1, p.223., Mai 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5956792/>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

LAUER, G.M.; WALKER, B.D. Hepatitis C virus infection. **N Engl J Med.** v. 345, n. 1, p. 41-52. Jul. 2001. Disponível em: [https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200107053450107?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200107053450107?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed). Acesso em: 09 Fev. 2020.

LAVIGNE-LISSALDE, G.; SCHVED, J.F.; GRANIER, C.; VILLARD, S. Anti-factor VIII antibodies: a 2005 update. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 94, n. 4, p. 760-9, Out.2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16270627-anti-factor-viii-antibodies-a-2005-update/>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

LEISSINGER, C.; COOPER, D.L; SOLEM, C.T; HTRS INVESTIGATORS. Assessing the impact of age, race, ethnicity and inhibitor status on functional limitations of patients with severe and moderately severe haemophilia A. **Haemophilia**, v.17, n. 6, p.884–889, Nov 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21447095-assessing-the-impact-of-age-race-ethnicity-and-inhibitor-status-on-functional-limitations-of-patients-with-severe-and-moderately-severe-haemophilia-a/>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. **Nat Rev Microbiol.** v.11, n.10, p. 688-700. Out. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3897199/>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

LINGALA, S.; GHANY, M.G. Natural History of Hepatitis C. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 44, n. 4, p. 717-734, Dec. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5939344/>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

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, Jun 2004. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1538-7836.2004.00802.x?sid=nlm%3Apubmed>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

LUQUIN, E.; LARREA, E.; CIVEIRA, M.P.; PRIETO, J.; ALDABE, R. HCV structural proteins interfere with interferon-alpha Jak/STAT signalling pathway. **Antiviral Res.** v. 76, n. 2, p.194–197, Nov 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166354207003622?via%3Dihub>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

LUSHER, J.M; SALZMAN, P.M. Viral safety and inhibitor development associated with factor VIIIc ultra-purified from plasma in hemophiliacs previously unexposed to factor VIIIc concentrates. The Monoclate Study Group, **Semin. Hematol.** v. 27, n.2, p.1–7, Abr. 1990. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1965615>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

MAHLANGU, J.; CERQUIERA, M.; SRIVASTAVA, A. Emerging therapies for haemophilia - Global perspective. **Haemophilia**, v. 24, p. 15–21, Mai. 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/hae.13510>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

MANCO-JOHNSON, M.J.; ABSHIRE, T. C.; SHAPIRO, A.D.; RISKE, B.; HACKER, M.R.; KILCOYNE, R.; INGRAM, J.D.; MANCO-JOHNSON, M.L.; FUNK, S.; JACOBSON, L.; VALENTINO, L.A.; HOOTS, W.K.; BUCHANAN, G.R.; DIMICHELE, D.; RECHT, M.; BROWN, D.; LEISSINGER, C.; BLEAK, S.; COHEN, A.; MATHEW, P.; MATSUNAGA, A.; MEDEIROS, D.; NUGENT, D.; THOMAS, G.A.; THOMPSON, A.A.; MCREDMOND, K.; SOUCIE, J. M.; AUSTIN, H.; EVATT, B.L. Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia. **N Engl J Med**, v. 357, n. 6, p. 535-544, Aug 2007. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa067659?articleTools=true>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

MANNUCCI, P.M; RUGGERI, Z.M. Circulating anticoagulants in haemophilia. **Lancet** v. 296, p.1360, Dez. 1970. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673670923822>. Acesso em: 09 Fev. 2020

MARTINS, M.L.; CHAVES, D.G.; SILVA-MALTA, M.C.F.; BOLINA-SANTOS, E.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.; CARMO, R.A. Hepatitis C and history of FVIII inhibitor development in a long-term cohort of Brazilian patients with haemophilia A. **Haemophilia**. United Kingdom. Fev 2020. Carta. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/hae.13944>. Acesso em: 28 Mar. 2020.

MARTINS, T.; NARCISO-SCHIAVON, J.L.; SCHIAVON, L.D.L. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, p. 107-112, Fev. 2011. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42302011000100024&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302011000100024&nrm=iso). Acesso em: 08 Fev. 2020.

MAZEPA, M.A.; MONAHAN, P E.; BAKER, J.R.; RISKE, B. K.; SOUCIE, J.M.; US HEMOPHILIA TREATMENT CENTER NETWORK. Men with severe hemophilia in the United States: birth cohort analysis of a large national database. **Blood**, v. 127, n. 24, p. 3073-3081, Jun. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4911863/>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

MESSINA, J.P.; HUMPHREYS, I.; FLAXMAN, A.; BROWN, A.; COOKE, G.S.; PYBUS, O.G.; BARNES, E. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v. 61, n. 1, p. 77-87, Jan 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25069599>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

METSALU, T.; VILO, J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. **Nucleic Acids Res**, v. 43, n. W1, p. W566-570, Jul 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4489295/>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

MIHM, S.; SCHWEYER, S.; RAMADORI, G. Expression of the chemokine IP-10 correlates with the accumulation of hepatic IFN-gamma and IL-18 mRNA in chronic hepatitis C but not in hepatitis B. **J Med Virol**. v.70, n.4, p.562–570, Ago 2003. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jmv.10431>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

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. Disponível em: [http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_diagnostico\\_coagulopatias\\_hereditarias\\_plaqueopatias.pdf](http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_diagnostico_coagulopatias_hereditarias_plaqueopatias.pdf). Acesso em: 02 Fev. 2020.

MORADPOUR, D.; PENIN, F.; RICE, C.M. Replication of hepatitis C virus. **Nat Rev Microbiol.** v. 5, n. 6, p. 453-463, Jan 2007. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Francois\\_Penin/publication/6344573\\_Replication\\_of\\_Hepatitis\\_C\\_Virus/links/53d638410cf228d363ea464f/Replication-of-Hepatitis-C-Virus.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Francois_Penin/publication/6344573_Replication_of_Hepatitis_C_Virus/links/53d638410cf228d363ea464f/Replication-of-Hepatitis-C-Virus.pdf). Acesso em: 08 Fev. 2020.

MOSLEY, J. W.; OPERSKALSKI, E. A.; TOBLER, L. H.; BUSKELL, Z. J. ANDREWS, W.W.; PHELPS, B.; DOCKTER, J.; GIACHETTI, C.; SEEFF, L.B.; BUSCH, M.P. The course of hepatitis C viraemia in transfusion recipients prior to availability of antiviral therapy. **J Viral Hepat.** v. 15, n. 2, p. 120-128, Feb 2008. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2893.2007.00900.x>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

MURATA, M.; NABESHIMA, S.; MAEDA, N.; NAKASHIMA, H.; KASHIWAGI, S.; HAYASHI, J. Increased frequency of IFN-gamma-producing peripheral CD8<sup>+</sup> T cells with memory-phenotype in patients with chronic hepatitis C. **J Med Virol.** v.67, n.2, p.162-170, Ago. 2002. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jmv.2205>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

OBAID, A.; NAZ, A.; IKRAM, A.; AWAN, F.M.; RAZA, A.; AHMAD, J; ALI, A. Model of the adaptive immune response system against HCV infection reveals potential immunomodulatory agents for combination therapy. **Sci Rep.** v.8, n. 1, p. 8874, Jun 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5995896/>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

OLDENBURG, J.; MAHLANGU, J.; KIM, B.; SCHMITT, C.; CALLAGHAN, M.U; YOUNG, G.; SANTAGOSTINO, E.; KRUSE-JARRES, R.; NEGRIER, C.; KESSLER, C.; VALENTE, N.; ASIKANIUS, E.; LEVY, G.G.; WINDYGA, J.; SHIMA, M. Emicizumab Prophylaxis in Hemophilia A with Inhibitors. **New England Journal of Medicine,** v. 377, p. 809-818, Ago. 2017. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1703068>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

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, L.; MAMONOV, V.; TIMOFEEVA, M.; SOH, C.; GARG, P.; VAISHNAW, A.; AKINC, A.; SØRENSEN, B.; RAGNI, M.V. Targeting of antithrombin in hemophilia A or B with RNAi therapy. **N Engl J Med.** v.377, p. 819-828, Ago. 2017. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1616569>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

PATZWAHL, R.; MEIER, V.; RAMADORI, G.; MIHM, S. Enhanced expression of interferon-regulated genes in the liver of patients with chronic hepatitis C virus infection: detection by suppression-subtractive hybridization. **J Virol.** v.75, n.3, p.1332-1338, Jul, 2001. Disponível em: <https://jvi.asm.org/content/jvi/75/3/1332.full.pdf>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

PEERLINCK, K; ROSENDAAL, F.R; VERMYLEN, L. Incidence of inhibitor development in a group of young hemophilia A patients treated with lyophilised cryoprecipitate. **Blood,** v. 81, p.3332-3335, Jun. 1993. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8507870>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

PESTKA, J.M.; ZEISEL, M.B.; BLÄSER, E.; SCHÜRMAN, P.; BARTOSCH, B.; COSSET, F.L.; PATEL, A.H.; MEISEL, H.; BAUMERT, J.; VIAZOV, S.; RISPETER, K.; BLUM, H.E.; ROGGENDORF, M.; BAUMERT, T.F.; Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v.104, n.14, p.6025-30, Abr 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1851610/> Acesso em: 09 Fev. 2020.

PETERS, R.; HARRIS, T. Advances and innovations in haemophilia treatment. **Nature Reviews Drug Discovery,** v.17, p.493-508, Jun. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29880919/>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

PETERSON, D. **Am I TH1 or TH2 or TH17?** 2018. Página inicial. Disponível em: <https://wellnessalternatives-stl.com/2018/06/am-i-th1-or-th2-or-th17/> Acesso em: 05 Mar. 2020.

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.; GONZALEZ, A.C.S.; MAHLANGU, J.N.; BOIX, S.B.; CERQUEIRA, M.; EWING, N.P.; MALE, C.; OWAIDAH, T.; ARELLANO, S.V.; KOBRINSKY N.L.; MAJUMDAR, S.; GARRIDO, P.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.; BRAVO, P.A.; AGUILERA, P.R.; PREZOTTI, A.; SCHMITT, K.; WICKLUND, B.M.; ZULFIKAR, B.; ROSENDAAL, F.R. A Randomized Trial of Factor VIII and Neutralizing Antibodies in Hemophilia A. **N Engl J Med.** v.374, n.21, p. 2054-2064, Mai. 2016. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1516437>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

PIMENTEL, J.P.; CHAVES, D.G.; ARAÚJO, A.R.; DE ARAÚJO, E.M.; FRAPORTI, L.S.; NEVES, W.L.L.; ANDREA MONTEIRO TARRAGÔ, A.M.; TORRES, K.L.; GENTZ, S.H.L.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A.; MALHEIRO, A. Anti-inflammatory/regulatory cytokine microenvironment mediated by IL-4 and IL-10 coordinates the immune response in hemophilia A patients infected chronically with hepatitis C virus. **J Med Virol**, v.85, n.6, p.1009–1018, Abr. 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmv.23554>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

POYNARD, T.; BEDOSSA, P.; OPOLON, P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. **Lancet**, v. 349, n. 9055, p. 825-832, Mar 1997. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(96\)07642-8/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(96)07642-8/fulltext). Acesso em: 08 Fev. 2020.

PRESCOTT, R.; NAKAI, H.; SAENKO, E.L.; SCHARRER, I.; NILSSON, I.M.; HUMPHRIES, J.E.; HURST, D.; BRAY, G.; SCANDELLA, D., THE RECOMBINATE AND KOGENATE STUDY GROUPS. The Inhibitor Antibody Response Is More Complex in Hemophilia A Patients Than in Most Nonhemophiliacs With Factor VIII Autoantibodies. **Blood**, v.89, p.10, Mai 1997. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/89/10/3663/235964/The-Inhibitor-Antibody-Response-Is-More-Complex-in>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

PROKUNINA-OLSSON, L.; MUCHMORE, B.; TANG, W.; PFEIFFER, R.M.; PARK, H.; DICKENSHEETS, H.; HERGOTT, D.; PORTER-GILL, P.; MUMY, A.; KOHAAR, I.; CHEN, S.; BRAND, N.; TARWAY, M.; LIU, L.; SHEIKH, F.; ASTEMBORSKI, J.; BONKOVSKY, H.L.; EDLIN, B.R.; HOWELL, C.D.; MORGAN, T.R.; THOMAS, D.L.; REHERMANN, B.; DONNELLY, R.P.; O'BRIEN, T.R. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. **Nat Genet**, v. 45, n. 2, p. 164-171, Fev 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3793390/>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

RANGARAJAN, S.; WALSH, L.; LESTER, W.; PERRY, D.; MADAN, B.; LAFFAN, M.; YU, H.; VETTERMANN, C.; PIERCE, G. F.; WONG, W. Y.; PASI, K. J. AAV5–Factor VIII Gene Transfer in Severe Hemophilia A. **New England Journal of Medicine**, v.377, p. 2519–2530, Dez. 2017. Disponível em: <https://spiral.imperial.ac.uk/bitstream/10044/1/57163/2/NEJMoa1708483.pdf>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

REHERMANN, B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. **J Clin Invest.** v. 119, n. 7, p.1745–1754, Jul 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2701885/>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

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. **Br Med J (Clin Res Ed)**, 286, n. 6369, p. 929-933, Mar 1983. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1547325/pdf/bmjcred00545-0017.pdf> Acesso em: 02 Fev. 2020.

ROCINO, A.; FRANCHINI, M.; COPPOLA, A. Treatment and Prevention of Bleeds in Haemophilia Patients with Inhibitors to Factor VIII/IX. **Journal of Clinical Medicine**, v.6, p.46, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5406778/>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

SHAHBAZI S, MAHDIAN R. Factor VII Gene Defects: Review of Functional Studies and Their Clinical Implications. **Iran Biomed J** v.23, n. 3, p.165–174, Mai. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6462297/pdf/IBJ-23-165.pdf>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

SHARMA, S.A.; FELD, J.J. Acute hepatitis C: management in the rapidly evolving world of HCV. **Curr Gastroenterol Rep**, v. 16, n. 2, p. 371, Feb 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11894-014-0371-7>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

SHIMA, M. New hemophilia treatment employing a bispecific antibody to factors IXa and X. **Rinsho Ketsueki Japanese Journal of Clinical Hematology**. v. 56, n. 6, p. 623-631. Jun. 2015 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26256871/>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

SILVA, L. K.; SILVA, M. B.; LOPES, G. B.; RODART, I. F.; SILVA, LUCIANO KALABRIC, SILVA, MARIA BETÂNIA SOUZA DA, LOPES, GISELE BARRETO, RODART, ITATIANA FERREIRA, COSTA, F. Q.; SANTANA, N.P.; PARANÁ, R.; SANTANA, A.; REIS, M.G. Prevalence of hepatitis C virus infection and HCV genotypes among hemophiliacs in the State of Bahia, Northeastern Brazil: analysis of serological and virological parameters. **Rev Soc Bras Med Trop**, Uberaba, v. 38, n. 6, p. 496-502, Dez. 2005. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822005000600010](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822005000600010). Acesso em: 09 Fev. 2020.

SIMMONDS, P.; BECHER, P.; BUKH, J.; GOULD, E. A.; MEYERS, G.; MONATH, T.; MUERHOFF, S.; PLETNEV, A.; RICO-HESSE, R.; SMITH, D.B.; STAPLETON, J.T. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. **J Gen Virol**, 98, n. 1, p. 2-3, Jan 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5370391/>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

SMITH, D. B.; BECHER, P.; BUKH, J.; GOULD, E. A. MEYERS, G.; MONATH, T.; MUERHOFF, A.S.; PLETNEV, A.; RICO-HESSE, R.; STAPLETON, J.T.; SIMMONDS, P. Proposed update to the taxonomy of the genera Hepacivirus and Pegivirus within the Flaviviridae family. **J Gen Virol**, v. 97, n. 11, p. 2894-2907, Nov 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27692039>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

SMITH, D. B.; BUKH, J.; KUIKEN, C.; MUERHOFF, A. S.; RICE, C.M.; STAPLETON, J.T.; SIMMONDS, P. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. **Hepatology**, v. 59, n. 1, p. 318-27, Jan 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24115039>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

SRIVASTAVA, A.; BREWER, A.K.; MAUSER-BUNSCHOTEN, E.P.; KEY, N.S.; KITCHEN, S.; LLINAS, A.; LUDLAM, C.A.; MAHLANGU, J.N.; MULDER, J.N.; POON, M.C.; STREET, A.; TREATMENT GUIDELINES WORKING GROUP ON BEHALF OF THE WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA. Guidelines for the management of hemophilia. **Haemophilia**. Jan. 2013; v. 19, n. 1, p. 1-e47. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x> Acesso em: 08 Fev. 2020.

STUART C.R.; JUSTIN, R. B.; DAVID, L. T. Hepatitis C virus. In *Fields Virology*. 6 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v.2, p. 796-820. 2013.

SZABO, S. M.; BIBBY, M.; YUAN, Y.; DONATO, B. M.; R.JIMÉNEZ-MENDEZ, R.; CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, G.; RODRÍGUEZ-TORRES, M.; LEVY, A.R. The epidemiologic burden of hepatitis C virus infection in Latin America. **Ann Hepatol**, v. 11, n. 5, p. 623-635, 2012, Out. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1665268119314358>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

TAGLIAFERRI, A.; DI PERNA, C.; SANTORO, C.; SCHINCO, P.; SANTORO, R.; ROSSETTI, G.; COPPOLA, A.; MORFINI, M.; FRANCHINI, M.; ITALIAN ASSOCIATION OF HEMOPHILIA CENTERS. Cancers in patients with hemophilia: a retrospective study from the Italian Association of Hemophilia Centers. **J Thromb Haemost**, v. 10, n.1, p. 90-5. Jan. 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1538-7836.2011.04566.x>. Acesso em: 29 Mar. 2020.

TANAKA, Y.; NISHIDA, N.; SUGIYAMA, M.; KUROSAKI, M.; MATSUURA, K.; SAKAMOTO, N.; NAKAGAWA, M.; KORENAGA, M.; HINO, K.; HIGE, S.; ITO, Y.; MITA, E.; TANAKA, E.; MOCHIDA, S.; MURAWAKI, Y.; HONDA, M.; SAKAI, A.; HIASA, Y.; NISHIGUCHI, S.; KOIKE, A.; SAKAIDA, I.; IMAMURA, M.; ITO, K.; YANO, K.; MASAKI, N.; SUGAUCHI, F.; IZUMI, N.; TOKUNAGA, K.; MIZOKAMI, M. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. **Nat Genet**, v.41, n. 10, p. 1105-1109, Out. 2009. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ng.449>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

THALAPPILLIL, A.; RAGNI, M.V.; COMER, D.M.; YABES, J.G. Incidence and risk factors for hepatocellular cancer in individuals with haemophilia: A National Inpatient Sample Study. **Haemophilia**, v.25, n.2, p.221-228. Mar 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/hae.13668>. Acesso em: 29 Mar. 2020.

THALER, M.M., PARK, C.K., LANDERS, D.V., WARA, D.W., HOUGHTON, M., VEEREMAN-WAUTERS, G., SWEET, R.L., & HAN, J.H. Vertical transmission of hepatitis C virus. **Lancet**, v.338, n.8758, p:17–18, Jul. 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1676085/>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

THIMME, R.; BINDER, M.; BARTENSCHLAGER, R. Failure of innate and adaptive immune responses in controlling hepatitis C virus infection. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, n. 3, p. 663-83, Mai 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22142141>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

THIMME, R.; BUKH, J.; SPANGENBERG, H.C.; WIELAND, S.; PEMBERTON, J.; STEIGER, C.; GOVINDARAJAN, S.; PURCELL, R.H.; CHISARI, F.V. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 24, p. 15661-8, Nov 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12441397>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

THIMME, R.; OLDACH, D.; CHANG, K.M.; STEIGER, C.; RAY, S.C.; CHISARI, F.V. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. **J Exp Med**, v. 194, n. 10, p. 1395-1406, Nov 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11714747>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

THORAT, T.; NEUMANN, P.J.; CHAMBERS, J.D. Hemophilia Burden of Disease: A Systematic Review of the Cost-Utility Literature for Hemophilia. **J Manag Care Spec Pharm**, v. 24, n. 7, p. 632-642, Jul 2018. Disponível em: <https://www.jmcp.org/doi/10.18553/jmcp.2018.24.7.632>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

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. 247-251, Jan. 1995. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/7792738> Acesso em: 08 Fev. 2020.

VERBRUGGEN, B.; VAN HEERDE, W.; NOVÁKOVÁ, I.; LILICRAP, 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, Ago. 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12195715>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

VILLANO, S. A.; VLAHOV, D.; NELSON, K. E.; COHN, S.; THOMAS, D.L. Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. **Hepatology**, v. 29, n. 3, p. 908-914, Mar 1999. Disponível em: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/hep.510290311>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

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, Mai 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ajh.23957>. Acesso em: 09 Fev. 2020.

WATERS, E.K.; SIGH, J.; FRIEDRICH, U.; HILDEN, I.; SORENSEN, B.B. Concizumab, an anti-tissue factor pathway inhibitor antibody, induces increased thrombin generation in plasma from haemophilia patients and healthy subjects measured by the thrombin generation assay. **Haemophilia**. v.23, p.769-776, Set. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28594458/>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

WATSON, H.G.; LUDLAM, C.A.; REBUS, S.; ZHANG, L.Q.; PEUTHERER, J.F.; SIMMONDS, P. Use of several second generation serological assays to determine the true prevalence of hepatitis C virus infection in haemophiliacs treated with non-virus inactivated factor VIII and IX concentrates. **Br J Haematol**, v. 80, n. 4, p. 514-518, Apr. 1992. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2141.1992.tb04566.x>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

WHO. **Guidelines for the screening care and treatment of persons with chronic hepatitis C infection**. Geneva: WHO Library Cataloguing 2016. Disponível em: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/205035/9789241549615\\_eng.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/205035/9789241549615_eng.pdf?sequence=1). Acesso em: 08 Fev. 2020.

WHO. **Global Hepatitis Report**. Geneva: World Health Organization 2017. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255016/9789241565455-eng.pdf;jsessionid=A7D84C7F4F676E6024E153275A86B520?sequence=1>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

WFH. **Inhibitors in hemophilia: a primer** Fifth Edition Montreal, Canada: World Federation of Hemophilia 2018. Disponível em: <http://www1.wfh.org/publication/files/pdf-1122.pdf>. Acesso em: 09 Fev. 2020

XIMENES, R.A.A.; PEREIRA, L.M.B.; MARTELLI, C.M.T.; MERCHÁN-HAMANN, E.; STEIN, A.T.; FIGUEIREDO, G.M.; BRAGA, M. C.; MONTARROYOS, U. R.; BRASIL, L. M.; TURCHI, M. D.; FONSECA, J. C. F.; LIMA, M. L. C.; ALENCAR, L. C. A.; COSTA, M.; CORAL, G.; MOREIRA, R. C.; CARDOSO, M. R. A. Methodology of a nationwide cross-sectional survey of prevalence and epidemiological patterns of hepatitis A, B and C infection in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 26,n. 9,p. 1693-1704, Set. 2010. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-311X2010000900003&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2010000900003&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 08 Fev. 2020.

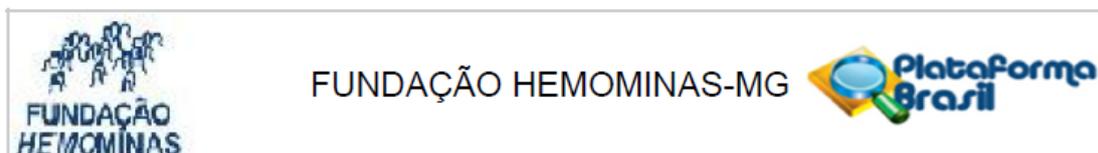
ZARIFE, M.A.S.; SILVA, L.K.; SILVA, M.B.S.; LOPES, G.B. BARRETO, M.L.; TEIXEIRA, M.G.; DOURADO, I.; REIS, M.G. Prevalence of hepatitis C virus infection in north-eastern Brazil: a population-based study. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.100, n. 7, p. 663-668, Jul. 2006. Disponível em: <https://academic.oup.com/trstmh/article-abstract/100/7/663/1885538>. Acesso em: 08 Fev. 2020.

ZEREMSKI, M.; PETROVIC, L. M.; TALAL, A. H. The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection. **J Viral Hepat**, v. 14, n. 10, p. 675-687, Out 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2893.2006.00838.x>. Acesso em: 10 Fev. 2020.

ZEREMSKI, M.; PETROVIC, L.M.; CHIRIBOGA, L.; BROWN, Q.B.; YEE, H.T.; KINKHABWALA, M.; JACOBSON, I.M.; DIMOVA, R.; MARKATOU, M.; TALAL, A.H. Intrahepatic levels of CXCR3-associated chemokines correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 48, n. 5, p. 1440-1450, Nov. 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2579317/>. Acesso em: 10 Fev. 2020.

## 8 ANEXOS

### ANEXO 1



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Estudo do desfecho da infecção pelo HCV em pacientes com hemoglobinopatias e coagulopatias e avaliação do impacto do tratamento da infecção sobre a doença genética de base.

**Pesquisador:** Marina Lobato Martins

**Área Temática:**

**Versão:** 5

**CAAE:** 17781113.0.0000.5118

**Instituição Proponente:** FUND CENTRO HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DE MINAS GERAIS

**Patrocinador Principal:** FUND CENTRO HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DE MINAS GERAIS

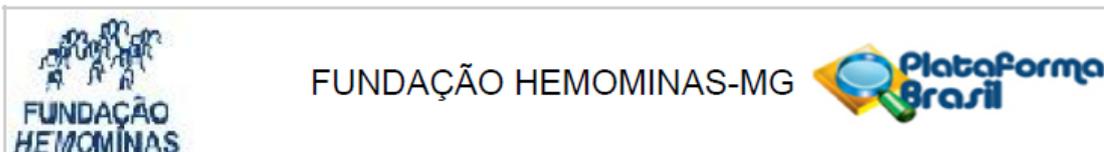
##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.630.250

##### Apresentação do Projeto:

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, cerca de 150 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas pelo vírus da hepatite C (HCV) no mundo, e mais de 350.000 morrem a cada ano por doenças hepáticas relacionadas ao HCV. O curso da infecção pelo HCV é variável entre os indivíduos infectados, tendo aqueles que apresentam clearance viral espontâneo, ou se mantêm cronicamente infectados num estado assintomático ou com evolução para doença hepática grave. O desfecho da infecção e resposta ao tratamento depende de fatores virais, como genótipo viral, e de fatores do hospedeiro e ambientais, como polimorfismos genéticos e etilismo, por exemplo. Pacientes politransfundidos representavam uma população de alto risco para adquirir o HCV via transfusional antes da introdução da triagem para HCV nos bancos de sangue e de métodos de inativação viral na produção dos hemoderivados. Desse modo, a infecção por HCV é uma das mais prevalentes em pacientes com anemia falciforme e hemofílicos. As hemoglobinopatias e coagulopatias, como a anemia falciforme e a hemofilia, por exemplo, são doenças genéticas de manifestações clínicas complexas e variáveis, demandando acompanhamento multidisciplinar. O objetivo desse estudo é traçar o perfil dos pacientes com hemoglobinopatias e coagulopatias com infecção pelo HCV atendidos no Hemocentro de Belo Horizonte, Fundação Hemominas, buscando identificar as características epidemiológicas, clínicas e virológicas, a fim de traçar o curso natural da infecção pelo HCV, e identificar preditores de

Endereço: Alameda Ezequiel Dias. 321  
 Bairro: Santa Efigênia CEP: 30.130-110  
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
 Telefone: (31)3768-4587 Fax: (31)3768-4600 E-mail: cep@hemominas.mg.gov.br



Continuação do Parecer: 2.630.250

resposta ao tratamento da infecção viral, assim como avaliar se o tratamento antiviral interfere na doença genética de base. Com este estudo, a Fundação Hemominas irá conhecer qual o perfil e como está a evolução clínica dos pacientes com hemoglobinopatias e coagulopatias infectados pelo HCV, e poderá avaliar se o manejo desses pacientes está sendo adequado.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Avaliar o desfecho da infecção pelo HCV em pacientes com hemoglobinopatias e coagulopatias e caracterizar sua resposta ao tratamento.

Objetivo Secundário:

1- Determinar a prevalência da exposição ao vírus da hepatite C ao longo do período de 1992 a 2013 nos pacientes com hemoglobinopatias e coagulopatias cadastrados no Hemocentro de Belo Horizonte. 2- Determinar a porcentagem de pacientes com cura espontânea e a prevalência da infecção crônica pelo vírus da hepatite C, e dentre esses, a porcentagem de pacientes que evoluíram para doença hepática. 3- Determinar os fatores sócio-demográficos, epidemiológicos, clínicos e virológicos associados à infecção pelo HCV. 4- Determinar a proporção de pacientes portadores de hepatite C que receberam tratamento antiviral. 5- Determinar a tolerabilidade dos pacientes portadores de hepatite C ao tratamento antiviral. 6- Determinar a taxa de resposta virológica sustentada (RVS ou  $\zeta$ cura $\zeta$ ) nos pacientes tratados. 8- Identificar marcadores de resposta ao tratamento:

genótipo viral, polimorfismo do gene IL28B, polimorfismo e expressão de genes marcadores de resposta imunológica.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

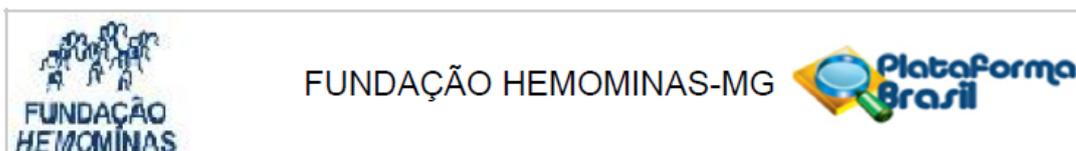
Riscos:

Um dos riscos associados a esse estudo é o de quebra de sigilo dos dados do paciente. No entanto, toda a equipe está comprometida em manter o sigilo do paciente. O banco de dados será mantido no Serviço de Pesquisa da Fundação Hemominas, sob guarda dos pesquisadores, sendo o acesso ao arquivo eletrônico protegido por senha. Outro risco é o da coleta de sangue, que pode causar dor e hematoma no local da picada. Essa será feita utilizando material descartável e por profissional treinado da instituição.

Benefícios:

Poderá haver benefício direto ao participante, no caso do conhecimento dos polimorfismos de IL28B preditores de resposta ao tratamento. O conhecimento do perfil dos pacientes com hemoglobinopatias e coagulopatias infectados pelo HCV possibilitará melhor adequação no

Endereço: Alameda Ezequiel Dias, 321  
 Bairro: Santa Efigênia CEP: 30.130-110  
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
 Telefone: (31)3768-4587 Fax: (31)3768-4600 E-mail: cep@hemominas.mg.gov.br



Continuação do Parecer: 2.630.250

acompanhamento e tratamento desses indivíduos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de pesquisa relevante que já foi aprovada pelo CEP Hemominas, sendo submetida Emenda para inclusão de membro na equipe de pesquisa.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os Termos de apresentação obrigatória foram submetidos por ocasião da submissão original, vindo a presente emenda instruída com o Termo de Compromisso referente ao membro a ser incluído na equipe.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Trata-se de emenda para a inclusão de Matheus Bossi Delucca de Faria como membro da equipe para consulta aos prontuários dos participantes da pesquisa.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Tratando-se de Emenda para inclusão de membro, sendo apresentado o termo de Compromisso devidamente assinado e não havendo qualquer alteração no projeto em questão, poderá a presente emenda ser aprovada.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_110884_8_E4.pdf	18/04/2018 14:25:18		Aceito
Outros	TermoCompromissoMatheus.pdf	18/04/2018 14:21:26	Marina Lobato Martins	Aceito
Outros	emendaAbril2018.pdf	18/04/2018 14:20:53	Marina Lobato Martins	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.doc	31/08/2017 16:19:04	Marina Lobato Martins	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Anexo 1_TCLE.doc	18/06/2013 15:27:39		Aceito
Folha de Rosto	folha de rosto assinada.pdf	18/06/2013 15:25:33		Aceito

Endereço: Alameda Ezequiel Dias. 321  
 Bairro: Santa Efigênia CEP: 30.130-110  
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
 Telefone: (31)3768-4587 Fax: (31)3768-4600 E-mail: cep@hemominas.mg.gov.br



Continuação do Parecer: 2.630.250

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BELO HORIZONTE, 02 de Maio de 2018

---

**Assinado por:**

**Tatiana Balaguer Abramo Mendes**  
(Coordenador)

Endereço: Alameda Ezequiel Dias. 321  
Bairro: Santa Efigênia CEP: 30.130-110  
UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
Telefone: (31)3768-4587 Fax: (31)3768-4600 E-mail: cep@hemominas.mg.gov.br

## ANEXO 2



Página 1 de 2

**TCLE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISA CIENTÍFICA**

*Projeto: Estudo do desfecho da infecção pelo HCV em pacientes com hemoglobinopatias e coagulopatias e avaliação do impacto do tratamento da infecção sobre a doença genética de base.*

Vimos pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido convidar você a participar de um projeto de pesquisa da Fundação Hemominas. A participação neste estudo é voluntária e você não terá nenhum gasto. Você tem o direito de escolher não fazer parte ou desistir do estudo em qualquer momento, sem perda de qualquer benefício na Fundação Hemominas.

Em algum momento, você foi diagnosticado com hepatite C. A progressão da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) varia muito de pessoa para pessoa e seu acompanhamento é especialmente importante em pacientes com doença falciforme e hemofilia. O objetivo deste estudo é avaliar o desfecho da infecção pelo HCV em pacientes com anemia falciforme e com hemofilia e caracterizar sua resposta ao tratamento ao vírus HCV.

Se você concordar em participar deste estudo, você será solicitado a fornecer um pouco de sangue (5mL) e saliva 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. Sua amostra de sangue será utilizada para realização de testes do projeto de pesquisa (análises de DNA para pesquisa de indivíduos com melhor ou pior resposta ao tratamento e dosagem de citocinas e quimiocinas do sistema imune). Os resultados dos testes de DNA serão anexados ao seu prontuário e você poderá solicitar informações dos resultados ao médico que te acompanha no Hemocentro. Os riscos e desconfortos deste estudo incluem a dor da picada de uma agulha e uma pequena chance de cor roxa no local de coleta do sangue.

O conhecimento que for adquirido na pesquisa poderá trazer informações e orientações futuras em relação ao tratamento da hepatite C. 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 dos seus prontuários médicos. Na divulgação dos resultados, seu nome não será mostrado, garantindo a você sigilo e privacidade.

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 das coagulopatias e hemoglobinopatias. 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.



- Autorizo a guarda do material coletado para estudos futuros.
- Não autorizo a guarda do material coletado para estudos futuros.

#### 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 dessa pesquisa.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
Data

#### Identificação do participante:

Nome: \_\_\_\_\_ Nº Prontuário: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

Equipe: Ricardo Andrade Carmo (31 3768 4596), Marina Lobato Martins, Daniel Gonçalves Chaves e Maria Clara Fernandes da Silva Malta (31 3768 4535)

Contato Comitê de Ética em Pesquisa: (31) 3768 4587 - cep@hemominas.mg.gov.br



Projeto de Pesquisa Coagulopatias e HCV

Ordem: \_\_\_\_\_  
2

4. Separado/Divorciado 5. Viúvo 8. NA 9. IGN	
2.8 Escolaridade: (anos) _____	[ ] [ ] [ ]
2.9 Profissão/Ocupação _____	[ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]
2.10 Bolsa família/risco social: 1. Sim 2. Não 8. NA 9. IGN	[ ] [ ]
<b>3.0 DIAGNÓSTICO DA COAGULOPATIA</b>	
3.1 Coagulopatia: 1. Hemofilia A 2. Hemofilia B 3. D. Von Willebrand 4. Trombastenia Glanzmann 5. Outra: _____ 8. NA 9. IGN	[ ] [ ]
3.2 Gravidade Coagulopatia: 1. Leve 2. Moderada 3. Grave 8. NA 9. IGN	[ ] [ ]
3.3 Idade na época do diagnóstico definitivo da coagulopatia (anos): _____	[ ] [ ] [ ] [ ]
<b>4.0 HISTÓRIA TRANSFUSIONAL</b>	
4.1 Já recebeu hemotransusão? 1. Sim 2. Não 8. NA 9. IGN	[ ] [ ]
4.2 Data da primeira hemotransusão: ____ / ____ / ____	[ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]
4.3 Uso exclusivo de hemoderivado industrializado (inativado): 1. Sim 2. Não 8. NA 9. IGN	[ ] [ ]
4.4 Recebeu crioprecipitado: 1. Sim 2. Não 8. NA 9. IGN	[ ] [ ]
4.5 Recebeu plasma fresco congelado: 1. Sim 2. Não 8. NA 9. IGN	[ ] [ ]
4.6 Presença de Inibidor: 1. Sim, c/títulos baixos 2. Sim, c/títulos altos 3. Sim, apenas no passado 4. Não 8. NA 9. IGN	[ ] [ ]
4.7 Maior dosagem de inibidor: _____ UI/mL	[ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]
4.8 Última dosagem de inibidor: _____ UI/mL	[ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]
4.9 Data da última dosagem de inibidor: ____ / ____ / ____	[ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]
<b>5.0 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HCV (HEPATITE C)</b>	
5.1 Data do primeiro anti-HCV (EIA) reativo: ____ / ____ / ____	[ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]
5.2 Houve registro de soroconversão: 1. Sim 2. Não 8. NA 9. IGN	[ ] [ ]
5.3 Se soroconversão, data do último anti-HCV não reativo: ____ / ____ / ____	[ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]
5.4 Anti-HCV (RIBA): 1. Positivo 2. Negativo 3. Indeterm. 8. NA 9. IGN	[ ] [ ]

Projeto de Pesquisa Coagulopatias e HCV

Ordem: \_\_\_\_\_  
3

5.5 RNA-HCV (PCR) Pré-tratamento: 1. Positivo 2. Negativo 3. Indeterm. 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
5.6 Genótipo HCV: 1.Gen 1 2.Gen 2 3. Gen 3 4. Gen 4 5. Gen 5 6. Gen 6 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
5.7 Carga viral HCV (pré-tratamento): _____ (log: _____)	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<b>6.0 DEMAIS RESULTADOS SOROLÓGICOS</b>	
6.1 VDRL: 1. Reativo (Maior título:_____) 2. Não reativo 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
6.2 Sífilis - treponêmico (HAI, FTA-Abs, EIA): 1. reativo 2. não reativo 3. Indeterm. 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
6.3 Chagas (HAI/RIF/EIA): 1. Reativo (2 testes) 2. Não reativo 3. Indet. 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
6.4 HBsAg: 1. Reativo 2. Não reativo 3. Indet. 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
6.5 Anti-HBc-total: 1. Reativo 2. Não reativo 3. Indet. 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
6.6 Anti-HIV (EIA): 1. Reativo 2. Não reativo 3. Indet. 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
6.7 Anti-HIV (WB): 1. Reativo 2. Não reativo 3. Indet. 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
6.8 Anti-HTLV (EIA): 1. Reativo 2. Não reativo 3. Indet. 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
6.9 Anti-HTLV (WB): 1. Reativo 2. Não reativo 3. Indet. 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
6.10 Anti-HAV-IgG: 1. Reativo 2. Não reativo 3. Indet. 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
6.11 Anti-HBs: 1. Pos $\leq 10$ mUI/ml 2. Pos $> 10$ mUI/ml 3 Neg 8. NA 9.IGN	<input type="checkbox"/>
6.12 HBeAg: 1. Reativo 2. Não reativo 3. Indet. 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
6.13 Anti-HBe: 1. Reativo 2. Não reativo 3. Indet. 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
<b>7.0 OUTRAS CARACTERISTICAS EPIDEMIOLÓGICAS</b>	
7.1 Uso de drogas ilícitas: 1. Sim 2. Não 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
7.2 Múltipla parceria sexual: 1. Sim 2. Não 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
7.3 HSH: 1. Sim 2. Não 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
7.4 Tatuagem: 1. Sim 2. Não 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>

Projeto de Pesquisa Coagulopatias e HCV

Ordem: \_\_\_\_\_  
4

7.5 Endoscopias: 1. Sim 2. Não 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
<b>8.0 CARACTERÍSTICAS DA HEPATITE C</b>	
8.1 ALT: 1. Normal 2. Flutuante 3. Persistentemente elevada 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
8.2 AST: 1. Normal 2. Flutuante 3. Persistentemente elevada 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
8.3 Plaquetas: 1. > 150.000/mm <sup>3</sup> 2. 50.000-150.000/mm <sup>3</sup> 3. < 50.000/mm <sup>3</sup> 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
8.4 Ultrassom com características de fibrose hepática avançada: 1. Sim 2. Não 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
8.5 Ultrassom com características de hipertensão portal: 1. Sim 2. Não 3. Esplenomegalia 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
8.6 Ultrassom com nódulo hepático: 1. Sim 2. Não 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
8.7 Biópsia hepática : 1. Sim 2. Não 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
8.8 Metavir: A: ____ F: ____	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
8.9 Registro de cirrose hepática: 1. Sim 2. Não 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
8.10 Registro de hipertensão portal: 1. Sim 2. Não 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
8.11 Registro de insuficiência hepática: 1. Sim 2. Não 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
8.12 Registro de transplante hepático: 1. Sim 2. Não 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
8.13 Registro de outro sinal/sintoma de insuficiência hepática: 1. Sim: _____ 2. Não 3. Esplenomegalia 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
<b>9.0 COMORBIDADES</b>	
9.1 Esquistossomose: 1. Sim 2. Não 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
9.2 Etilismo crônico: 1. Sim 2. Não 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
9.3 Uso crônico de drogas hepatotóxicas: 1. Sim _____ 2. Não 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
9.4 Diabetes mellitus: 1. Sim 2. Não 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
9.5 Outras comorbidades: 1. Sim _____ 2. Não 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>

Projeto de Pesquisa Coagulopatias e HCV

Ordem: \_\_\_\_\_  
5

<b>10.0 TRATAMENTO DA HEPATITE C</b>	
10.1 Registro de indicação de tratamento da hepatite C: 1. Sim (Data: ___/___/___) 2. Não 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
10.2 Realizou algum tratamento antiviral p/ HCV? 1. Sim 2. Não 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
10.3 Número de tratamentos antivirais realizados: _____	<input type="checkbox"/>
10.4 Primeiro tratamento c/ : 1. INF 2. INF+RBV 3. Peg-INF 4. Peg-INF+ RBV 5. Peg-INF+RBV+IP 8. NA 9. IGN Data: ___/___/___	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
10.5 Total de semanas sob terapia no primeiro tratamento: _____	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
10.6 Característica do primeiro tratamento: 1. Completo 2. Suspenso por intolerância 3. Suspenso por falha virológica 4. Suspenso por má adesão 5. Suspenso por outro motivo: _____ 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
10.7 Resposta ao primeiro tratamento: 1 Não respondedor pleno (sem RVP) 2. Não respondedor parcial (RVPp) 3. RVF com recidiva 4. RVS (Cura virológica) 5. Outro: _____ 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
10.8 Segundo tratamento c/ : 1. INF 2. INF+RBV 3. Peg-INF 4. Peg-INF+ RBV 5. Peg-INF+RBV+IP 8. NA 9. IGN Data: ___/___/___	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
10.9 Total de semanas sob terapia no segundo tratamento: _____	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
10.10 Característica do segundo tratamento: 1. Completo 2. Suspenso por intolerância 3. Suspenso por falha virológica 4. Suspenso por má adesão 5. Suspenso por outro motivo: _____ 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
10.11 Resposta ao segundo tratamento: 1 Não respondedor pleno (sem RVP) 2. Não respondedor parcial (RVPp) 3. RVF com recidiva 4. RVS (Cura virológica) 5. Outro: _____ 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
10.12 Terceiro tratamento c/ : 1. INF 2. INF+RBV 3. Peg-INF 4. Peg-INF+ RBV 5. Peg-INF+RBV+IP 8. NA 9. IGN Data: ___/___/___	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
10.13 Total de semanas sob terapia no terceiro tratamento: _____	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
10.14 Característica do terceiro tratamento: 1. Completo 2. Suspenso por intolerância 3. Suspenso por falha virológica 4. Suspenso por má adesão 5. Suspenso por outro motivo: _____ 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
10.15 Resposta ao terceiro tratamento: 1 Não respondedor pleno (sem RVP) 2. Não respondedor parcial (RVPp) 3. RVF com recidiva 4. RVS (Cura virológica) 5. Outro: _____ 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>

Projeto de Pesquisa Coagulopatias e HCV

Ordem: \_\_\_\_\_  
6

10.16 Quarto tratamento c/ : 1. INF 2. INF+RBV 3. Peg-INF 4. Peg-INF+ RBV 5. Peg-INF+RBV+IP 8. NA 9. IGN Data: ___/___/___	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
10.17 Total de semanas sob terapia no quarto tratamento: _____	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
10.18 Característica do quarto tratamento: 1. Completo 2. Suspenso por intolerância 3. Suspenso por falha virológica 4. Suspenso por má adesão 5. Suspenso por outro motivo: _____ 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
10.19 Resposta ao quarto tratamento: 1 Não respondedor pleno (sem RVP) 2. Não respondedor parcial (RVPp) 3. RVF com recidiva 4. RVS (Cura virológica) 5. Outro: _____ 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
10.20 Registro de má adesão: 1. Sim 2. Não 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
10.21 Uso de ribavirina: 1. Dose plena (1000-1250mg/dia) 2. Redução dose por intolerância/toxicidade (250-750mg/dia) 3. Suspensão por intolerância/toxicidade 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
10.22 Registro de toxicidade ao tratamento: 1. Sim 2. Não 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
10.23 Se toxicidade, quais foram registradas (soma): 1. Anemia ( $\downarrow$ Hb > 1,0g%) 2. Leucopenia 4. Plaquetopenia 8. Febre 16. Mialgia 32. Astenia 64. Depressão 132. Irritabilidade 264. Emagrecimento 512. Aumento nos sangramentos 1024. Falência/descompensação hepática 2048: Outros: _____ 88. NA 99. IGN	<input type="checkbox"/>
<b>11.0 MARCADOR DE RESPOSTA AO TRATAMENTO</b>	
11.1 Polimorfismos IL28B rs80999177 (T/G): 1. TT 2. TG 3. GG 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
11.2 Polimorfismos IL28B rs12979860 (T/C): 1. TT 2. TC 3. CC 8. NA 9. IGN	<input type="checkbox"/>
<b>Observações:</b>	