

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

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

Letícia Lemos Jardim

**AVALIAÇÃO DOS FATORES CLÍNICOS, GENÉTICOS E IMUNOLÓGICOS
RELACIONADOS AO DESENVOLVIMENTO DE INIBIDORES EM HEMOFILIA.**

Belo Horizonte

2019

Letícia Lemos Jardim

**AVALIAÇÃO DOS FATORES CLÍNICOS, GENÉTICOS E IMUNOLÓGICOS
RELACIONADOS AO DESENVOLVIMENTO DE INIBIDORES EM HEMOFILIA.**

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

Orientadora: Profa. Dra. Suely Meireles Rezende

Co-Orientador: Dr. Daniel Gonçalves Chaves

Belo Horizonte

2019

J37a Jardim, Leticia Lemos.
Avaliação dos fatores clínicos, genéticos e imunológicos relacionados ao desenvolvimento de inibidores em hemofilia [recurso eletrônico]. / Leticia Lemos Jardim. -- Belo Horizonte: 2019.
100f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Suely Meireles Rezende.
Coorientador (a): Daniel Gonçalves Chaves.
Área de concentração: Epidemiologia Clínica.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Hemofilia A. 2. Isoanticorpos. 3. Incidência. 4. Mortalidade. 5. Epidemiologia. 6. Dissertação Acadêmica. I. Rezende, Suely Meireles. II. Chaves, Daniel Gonçalves. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WH 325

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



ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA LETICIA LEMOS JARDIM

Realizou-se, no dia 02 de agosto de 2019, às 14:00 horas, Sala 829, 8º andar da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada **AVALIAÇÃO DOS FATORES CLÍNICOS, GENÉTICOS E IMUNOLÓGICOS RELACIONADOS AO DESENVOLVIMENTO DE INIBIDORES EM HEMOFILIA**, apresentada por **LETICIA LEMOS JARDIM**, número de registro 2015712504, graduada no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, à seguinte Comissão Examinadora: Profa. Suely Meireles Rezende - Orientadora (UFMG), Prof. Daniel Gonçalves Chaves - Coorientador (HEMOMINAS), Profa. Silvana Maria Elói Santos (UFMG), Profa. Lidyane do Valle Camelo (UFMG), Profa. Soraya Torres Gaze Jangola (FIOCRUZ), Prof. Erich Vinicius de Paula (UNICAMP).

A Comissão considerou a tese:

☒ Aprovada

☐ Reprovada

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

Belo Horizonte, 02 de agosto de 2019.

Profa. Suely Meireles Rezende (Doutor)

Prof. Daniel Gonçalves Chaves (Doutor)

Profa. Silvana Maria Elói Santos (Doutor)

Profa. Lidyane do Valle Camelo (Doutor)

Profa. Soraya Torres Gaze Jangola (Doutor)

Prof. Erich Vinicius de Paula (Doutor)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitora

Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-Reitor

Alessandro Fernandes Moreira

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Fábio Alves

Pró-Reitor de Pesquisa

Mário Campos

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor

Professor Humberto José Alves

Chefe do Departamento de Clínica Médica

Professora Valeria Maria Augusto

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

Coordenadora

Professora Teresa Cristina Abreu Ferrari

Subcoordenadora

Professora Suely Meireles Rezende

Colegiado

Professora Tereza Cristina Abreu Ferrari

Professora Luciana Costa Faria

Professora Luciana Diniz Silva

Professor. Paulo Caramelli

Professor Eduardo Garcia Vilela

Professora Suely Meireles Rezende

“Around here, we don't look backwards for very long. We keep moving forward, opening up new doors and doing new things. Because we are curious and curiosity keeps leading us down new paths.”

Walt Disney

AGRADECIMENTOS

À Dra. Suely Rezende, para quem não há agradecimento suficiente. Muito obrigada por todas as oportunidades que me concedeu, pela confiança, pelo carinho e pela amizade dos últimos sete anos.

Ao Dr. Daniel Chaves pela disponibilidade, suporte e pela gentileza em sua orientação.

Ao Igor pelo amor e apoio incondicional, presença e companheirismo.

Aos queridos Dani e Ricardo por contribuírem tanto na minha formação. Obrigada pelo encorajamento, pelo carinho de sempre e por mantermos a família unida, mesmo com a distância.

À Johanna van der Bom e Samantha Gouw por me receberem tão bem no Centro Médico da Universidade de Leiden e pela orientação enriquecedora.

À Camila Caram por “abrasileirar” os meus dias na Holanda e pela generosidade em me ajudar com as análises estatísticas.

À Christina Brommonschenkel pela dedicação enorme contribuição durante sua iniciação científica.

Aos amigos do grupo de pesquisa em Trombose e Hemostasia e aos amigos do laboratório de Hematologia Molecular pela convivência saudável, troca de experiências e pela presença sempre positiva.

Esse trabalho não seria possível sem o envolvimento de todos os colaboradores da Fundação Hemominas, Hemorio, Hemosc, Hemepar e Hemoes, muito obrigada.

Agradeço também aos familiares dos pacientes participantes, por acreditarem na seriedade do nosso trabalho.

A Capes e a Fapemig pelo apoio financeiro e pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional que me concederam durante o ano que passei na Universidade de Leiden/Holanda.

RESUMO

A hemofilia A (HA) congênita é uma doença hemorrágica, ligada ao cromossomo X, caracterizada pela deficiência do fator VIII (FVIII). O tratamento é realizado por meio da infusão de concentrado de FVIII para profilaxia e/ou tratamento das hemorragias. Durante o tratamento, aproximadamente 10%-30% dos pacientes com HA desenvolvem aloanticorpos (inibidores) que neutralizam a atividade pró-coagulante do fator deficiente, levando à ineficácia da reposição. A erradicação dos inibidores pode ocorrer em até 80% dos casos, com o tratamento de imunotolerância. O objetivo desta tese foi avaliar os aspectos epidemiológicos da hemofilia e suas complicações, através da análise de incidência do desenvolvimento de inibidores, da mortalidade e causas de morte dos pacientes com hemofilia e da avaliação da relação do polimorfismo rs3754689 no gene da Lactase com o desenvolvimento de inibidor em pacientes brasileiros com HA. Para avaliação da incidência de inibidores e do polimorfismo genético, foi utilizada a coorte prospectiva do estudo HEMFIL, onde pacientes com hemofilia previamente não tratados ou minimamente tratados são acompanhados até 75 dias de exposição (DE) ao fator ou até o desenvolvimento de inibidor. Até o presente, 82 pacientes com HA (FVIII:C < 2%) foram incluídos em T0, dos quais, 30 pacientes desenvolveram inibidor (T1/Inibidor) e 41 pacientes completaram 75 DE sem inibidor positivo. A incidência acumulada para o desenvolvimento de inibidor foi de 36,0% (IC 95%, 25,2-48,5), dos quais 25,0% (IC 95%, 15,6-37,9) correspondem a inibidores de alto título. A análise de frequência alélica não mostrou diferença do polimorfismo rs3754689 entre os grupos de pacientes com inibidor positivo e negativo ($p = 0,931$), nem entre os títulos de inibidor alto e baixo ($p = 0,386$).

A presente tese também analisou a taxa de mortalidade e as causas de morte dos pacientes com hemofilia no Brasil no período entre 2000-2014, utilizando como fonte de dados o Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM). Foram identificados 784 óbitos de pacientes com hemofilia entre 2000-2014 e a mortalidade neste grupo foi 13% maior quando comparada à população geral masculina (SMR 1,13, IC 95%, 1,01-1,16). A taxa de mortalidade padronizada reduziu ao longo dos 15 anos avaliados de 1,51 (IC 95%, 1,29-1,74) em 2000 para 0,89 (IC 95%, 0,74-1,04) em 2014. A hemorragia intracraniana permaneceu como importante causa de morte nesses pacientes.

Palavras-chave: Hemofilia, inibidores em hemofilia, mortalidade, incidência, imunologia

ABSTRACT

Congenital hemophilia A (HA) is an X-linked hemorrhagic disease characterized by deficiency of factor VIII (FVIII). Treatment is performed by infusion of FVIII concentrate for prophylaxis and/or treatment of hemorrhages. During treatment, approximately 10%-30% of patients with HA develop alloantibodies (inhibitors) that neutralize the procoagulant activity of the deficient factor, leading to ineffective replacement. Eradication of inhibitors can occur in up to 80% of cases with immunotolerance treatment. This thesis aimed to evaluate the epidemiological aspects of hemophilia and its complications, through the analysis of inhibitor incidence, mortality and causes of death of patients with hemophilia and the evaluation of the relationship of the rs3754689 polymorphism in the Lactase gene with the development of inhibitors in Brazilian patients with HA. To assess the incidence of inhibitors and genetic polymorphism, the prospective cohort of the HEMFIL study was used, in which previously untreated or minimally treated patients with hemophilia are followed up to 75 days of exposure (ED) to the factor or until the development of an inhibitor. To date, 82 patients with HA (FVIII:C < 2%) have been included in T0, of which 30 patients developed an inhibitor (T1/Inhibitor) and 41 patients completed 75 ED without positive inhibitor. The cumulative incidence for inhibitor development was 36.0% (95% CI, 25.2-48.5), of which 25.0% (95% CI, 15.6-37.9) correspond to high-titer inhibitors. Allele frequency analysis showed no difference in the rs3754689 polymorphism between the groups of patients with positive and negative inhibitor ($p = 0.931$), nor between high and low inhibitor titers ($p = 0.386$).

This thesis also analyzed the mortality rate and causes of death of patients with hemophilia in Brazil between 2000 and 2014, using the Mortality Information System (SIM) as a data source. A total of 784 deaths of patients with hemophilia were identified between 2000 and 2014, and mortality in this group was 13% higher when compared to the general male population (SMR 1.13, 95% CI, 1.01-1.16). The standardized mortality ratio decreased over the 15 years evaluated from 1.51 (95% CI, 1.29-1.74) in 2000 to 0.89 (95% CI, 0.74-1.04) in 2014. Intracranial hemorrhage remained an important cause of death in these patients.

Keywords: hemophilia, inhibitors in hemophilia, mortality, incidence, immunology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo da resposta imunológica à infusão de fator VIII em humanos	20
Figura 2. Delineamento do estudo original	27
Figura 3. Orientação para identificação de amostras	28
Figura 4. Tempos do estudo e coleta de amostras biológicas	30

SUMÁRIO

1. ANTECEDENTES CIENTÍFICOS.....	10
1. A hemofilia A.....	11
1.2. Hemofilia no Brasil.....	13
1.3. Inibidores em hemofilia.....	14
1.4. Fatores de risco para desenvolvimento de inibidor em hemofilia congênita.....	15
1.5. Imunologia e hemofilia.....	20
1.6. Mortalidade dos pacientes com hemofilia.....	22
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. Objetivo Geral.....	25
2.2. Objetivos Específicos.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 O estudo HEMFIL.....	27
3.1.1. Desenho do estudo.....	27
3.1.2 Locais do estudo.....	27
3.1.3 População do estudo.....	28
3.1.4. Considerações éticas do estudo.....	28
3.1.5. Variáveis.....	29
3.1.6. Coleta de amostras.....	29
3.1.7. Testes laboratoriais.....	31
3.1.7.1. Determinação da atividade coagulante dos fatores VIII e IX.....	31
3.1.7.2. Investigação e quantificação de inibidores contra fatores VIII e IX.....	31
3.1.7.2.1. Teste de triagem para inibidor.....	31
3.1.7.2.2. Quantificação dos inibidores pela técnica de Bethesda modificada.....	32
3.1.7.3. Análise do perfil imunológico.....	32
3.1.7.4. Análise do perfil genético.....	33
3.1.7.4.1. Extração de DNA genômico.....	33
3.1.7.4.2. Caracterização molecular da hemofilia A.....	33
3.1.8. Desfecho.....	33
3.1.9. Análise.....	34
4. RESULTADOS.....	42
4.1. Artigo 1	
<i>Inhibitor incidence in haemophilia A under exclusive use of a third-generation recombinant factor VIII concentrate: results of the HEMFIL Cohort Study.....</i>	42
4.2. Artigo 2	
<i>Mortality of patients with haemophilia in Brazil: First report</i>	47

4.3. Artigo 3	
<i>Variation of rs3754689 at lactase gene and inhibitors in admixed Brazilian patients with hemophilia A.....</i>	54
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

1.1 A hemofilia A

A hemofilia A (HA) é uma doença hemorrágica, caracterizada pela deficiência do fator VIII (FVIII), que acomete 1:5-10.000 nascidos vivos do sexo masculino (Ehrenforth et al, 1992).

Na maioria dos casos a hemofilia é hereditária, transmitida quase que exclusivamente a indivíduos do sexo masculino. Isto porque é uma doença genética, de herança recessiva, ligada ao cromossomo X (Hoyer, 1994). A deficiência do FVIII é resultante de uma alteração genética no gene F8, localizado na posição Xq28 (Gitschier et al, 1984). Assim, a cada gestação, uma mulher portadora apresenta a probabilidade de 50% de transmitir o alelo mutado a um filho do sexo masculino com hemofilia e filha do sexo feminino portadora (Pio et al, 2009). Entretanto, em cerca de 30% dos casos, não há história familiar da doença, que se origina a partir de uma nova mutação genética (*mutação de novo*).

A hemofilia adquirida resulta do desenvolvimento de auto-anticorpos, isto é, anticorpos circulantes contra a atividade pró-coagulante do FVIII endógeno (Green & Lechner, 1981). Essa condição é rara, com uma incidência estimada em 1:1.000.000 de habitantes por ano (Ordis & Altisent, 2002), e tem como causas doenças autoimunes, neoplasia maligna, pós-parto, idade avançada e uso de fármacos como a penicilina e outros (Green & Lechner, 1981). Em geral, tem início súbito com episódios hemorrágicos de difícil controle e os pacientes geralmente não respondem ao tratamento com infusões de FVIII. O objeto do presente estudo é a HA a congênita e, portanto, o termo hemofilia passa a referir, a partir daqui, a este tipo de doença.

Na forma grave, a HA se caracteriza principalmente por sangramentos intra-articulares e hemorragias musculares (Pio et al, 2009). Os episódios hemorrágicos podem surgir espontaneamente ou após traumas e sua gravidade varia de acordo com a atividade residual coagulante do FVIII deficiente. Pacientes com níveis circulantes inferiores a 1% do normal possuem a forma grave da doença, apresentando hemorragias espontâneas frequentes, principalmente hemartroses e hematomas musculares. Podem, ainda, apresentar hemorragias em órgãos internos, podendo levar à morte dependendo do local afetado e da gravidade. Os pacientes com hemofilia moderada possuem atividade do fator deficiente entre 1% e 5% do normal e apresentam quadros hemorrágicos mais brandos, principalmente após traumas, embora possam também apresentar sangramentos espontâneos com menor frequência. A hemofilia leve é caracterizada por níveis de fator entre 5% e 40% do normal e se associa a hemorragias após traumas ou procedimentos cirúrgicos (Antonarakis et al, 1995; White et al, 2001).

A maior parte das alterações genéticas relacionadas à HA são decorrentes de mutações de ponto, seguidas pelas deleções, inserções e inversões no gene F8, como as inversões dos íntrons 1 e 22 (Rossetti et al, 2008; Pio et al, 2009).

Do ponto de vista laboratorial, o diagnóstico da HA deve ser suscitado mediante alargamento do tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa), associado ao tempo de protrombina (TP) normal. O diagnóstico confirmatório é realizado por meio da dosagem do FVIII no plasma pela realização de testes funcionais e/ou antigênicos. Na hemofilia leve, o TTPa pode estar normal.

Ainda não existe cura para HA. Assim, o tratamento está basicamente fundamentado na infusão endovenosa de concentrado do FVIII deficiente em resposta aos episódios hemorrágicos (tratamento sob demanda) ou para preveni-los (tratamento profilático) (Gilles et al, 1993). O tratamento profilático é indicado para pacientes com hemofilia grave (isto é, para pacientes que apresentam menos de 1% de atividade do FVIII) (nível de evidência 1A) (Manco-Johnson et al, 2007), devendo ser mantido pelo menos até quando o paciente atingir a maturidade articular, por volta de 18 anos. As infusões devem ser iniciadas por volta de um a dois anos de idade, idealmente antes da ocorrência da segunda hemartrose (profilaxia primária) (Berntorp et al, 2003). A administração deve ocorrer de uma a três vezes por semana, podendo ser mais espaçada no caso de concentrados de longa ação.

Os concentrados de fator podem ser provenientes do plasma, isto é, purificados a partir do plasma humano, ou de origem recombinante, produzidos a partir de clonagem genética. Os fatores recombinantes são classificados em gerações, de acordo com o material utilizado em sua produção e sua meia-vida. Fatores recombinantes de primeira e segunda geração são produzidos utilizando material biológico em sua composição, ao contrário dos fatores de terceira e quarta geração, que possuem seu processo de formulação e obtenção livre de proteínas de origem humana ou animal. Os fatores recombinantes de quarta geração, além de serem livres de proteínas de origem humana ou animal, incorporam modificações em suas moléculas que aumentam sua meia-vida (Lai et al, 2017). Todos os produtos registrados até o momento são eficazes no controle dos sangramentos, independentemente da forma de produção.

Além dos episódios hemorrágicos e suas complicações agudas, os pacientes com hemofilia sofrem especialmente de três tipos potenciais de complicações crônicas: (i) as artropatias, que ocorrem em decorrência dos sangramentos intra-articulares recorrentes e podem levar à deficiência motora permanente; (ii) as doenças infecciosas transmitidas por produtos derivados do plasma, das quais a contaminação pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e as hepatites B e C são os principais problemas, e (iii) o desenvolvimento de aloanticorpos (inibidores) que inibem a função pró-coagulante do FVIII. A ocorrência das duas primeiras complicações reduziu drasticamente após o advento da profilaxia, da produção dos concentrados de origem recombinante, da maior segurança transfusional através da purificação/inativação viral dos produtos derivados do plasma e com a

implantação de triagem sorológica dos bancos de sangue. Desta forma, nos dias atuais, a principal complicação enfrentada pelos pacientes com hemofilia é o desenvolvimento de inibidores.

1.2. Hemofilia no Brasil

Atualmente, no Brasil, existem 12.432 pacientes com hemofilia cadastrados no Perfil de Coagulopatias do Ministério da Saúde, dos quais 10.395 têm hemofilia A (*World Federation of Haemophilia*, 2017). De acordo com dados da Federação Mundial de Hemofilia (2017), esta é a quarta maior população de pacientes com hemofilia no mundo, depois de Estados Unidos, Índia e China (*World Federation of Haemophilia*, 2017).

Desde 1993, o Ministério da Saúde Brasileiro fornece hemoderivados para distribuição no Sistema Único de Saúde (SUS) nos hemocentros estaduais. A partir de 2001, as compras de fatores pró-coagulantes derivados de plasma passaram a ser centralizadas, sendo o Ministério da Saúde o único comprador nacional desses produtos. Em 2007, o Ministério da Saúde implementou o programa de dose domiciliar, que consistiu na entrega de 3 doses de concentrado de fator para tratamento domiciliar a ser usado para reposição imediata em caso de sangramento. Em 2009 foi criado o Sistema Informatizado Hemovida web – coagulopatias, que é um registro nacional sobre coagulopatias hereditárias, que utiliza uma plataforma *web* para coleta de dados sócio-demográficos, clínicos, laboratoriais e de tratamentos dos pacientes com doenças hemorrágicas hereditárias (Rezende et al, 2017). O registro tem ainda um sistema de controle de estoque de medicamentos que liga a informação das Unidades Federadas ao Ministério da Saúde. O sistema é alimentado pelos hemocentros estaduais de tratamento de hemofilia.

A partir de 2011, o Ministério da Saúde passou a promover uma série de avanços na política de atenção aos pacientes com hemofilia. Foram implementados tratamentos como a imunotolerância e a profilaxia, que garantiram melhorias visíveis na qualidade de vida dos pacientes. A profilaxia consiste na reposição do fator de forma regular e contínua (de uma a três vezes na semana), que pode ser primária, quando tem início antes da segunda hemartrose e, portanto, antes das alterações osteocondrais em pacientes com idade até três anos; secundária, quando iniciada antes das alterações osteocondrais evidenciadas, mas com início após duas ou mais hemartroses; ou terciária, quando ocorre após evidência de alteração osteocondral (Ministério da Saúde, 2015). As profilaxias primária, secundária e terciária são indicadas para os pacientes com hemofilia grave.

Em 2012, o Brasil iniciou a aquisição de concentrado de fator de origem recombinante. Esta demanda foi justificada pela necessidade de produtos de alta segurança transfusional somada ao

aumento significativo da compra de concentrados de origem plasmática até então, o que impactou na capacidade de atendimento das empresas fabricantes deste produto. Ainda em 2012, o tratamento domiciliar deixou de ser considerado de urgência e passou a ser de prevenção e promoção à saúde, ocorrendo, então, a ampliação das doses domiciliares (Ministério da Saúde, 2015).

Em 2014, o fator de coagulação de tecnologia recombinante de terceira geração, rotulado com a marca Hemo-8r, passou a ser produzido em parceria pública privada com a empresa Hemobrás e se torna a opção de escolha para os pacientes acima de 30 anos de idade (cerca de 30% dos pacientes com hemofilia A). Adicionalmente, os pacientes continuam sendo atendidos com FVIII plasmático, também disponibilizado pelo Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2015).

1.3. Inibidores em hemofilia

Pacientes com hemofilia podem desenvolver anticorpos inibidores da atividade pró-coagulante do fator exógeno (Ehrenforth et al, 1992). No entanto, pacientes com hemofilia sem histórico de inibidor, assim como indivíduos saudáveis, também podem apresentar anticorpos não neutralizantes (não inibitórios) (Krudysz-Amblo et al, 2009; Whelan et al, 2013).

O desenvolvimento de inibidores, aloanticorpos IgG, é a principal complicação que acomete os pacientes com hemofilia nos dias atuais. Esses anticorpos bloqueiam os epitopos do FVIII, neutralizando a atividade terapêutica do fator infundido através do bloqueio de domínios funcionais da proteína (Ehrenforth et al, 1992, Darby et al, 2007; Walsh et al, 2015).

Clinicamente, a presença do inibidor dificulta a indução da hemostasia terapêutica nos pacientes, que passam a apresentar hemorragias de difícil controle e aumento no consumo do concentrado de fator (Ehrenforth et al, 1992). Entretanto, alguns pacientes podem não apresentar manifestações clínicas evidentes. Nesses casos, o diagnóstico pode ser confirmado através de testes laboratoriais de rotina (Dimichele, 2008).

Recomenda-se que todos os pacientes com hemofilia congênita sejam monitorados quanto ao desenvolvimento de inibidores assim que iniciem as infusões dos concentrados de fator deficiente. Desta forma, deve-se testar todos os pacientes ao diagnóstico e, a seguir, pelo menos a cada 10 dias de exposição (DE) ao fator deficiente até o 50º DE e, a partir de então, a cada 6 a 12 meses, enquanto o paciente estiver em uso do concentrado de fator. Considera-se um DE cada dia do calendário que o paciente receber a infusão de fator, independente do volume e da quantidade de doses administradas no dia. A pesquisa de inibidor também deve ser realizada antes de qualquer procedimento cirúrgico ou invasivo ou em qualquer ocasião em que a resposta ao tratamento não esteja ocorrendo da forma esperada (Ministério da Saúde, 2015). Os testes de triagem para

identificação de inibidor devem ser realizados com pelo menos três dias de intervalo entre as infusões de concentrado do fator deficiente, quando os níveis plasmáticos do fator estiverem reduzidos (Ministério da Saúde, 2015).

A presença de inibidor é inicialmente pesquisada através do teste da mistura (triagem), que combina um *pool* de plasmas normais com o plasma do paciente com hemofilia na mesma proporção e, após incubação, avalia se houve ou não correção no tempo de coagulação através do teste de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa). A não correção do TTPa no teste de mistura sugere a presença de um inibidor, exigindo então a confirmação através do teste de Bethesda, primeiramente proposto por Kasper (KASPER, 1975) e modificado em 1995, por Verbruggen e colaboradores (Verbruggen et al, 1995). As modificações para o teste de Bethesda foram sugeridas com o intuito de aumentar a especificidade do teste, reduzindo os resultados falso-positivos. A alteração ficou conhecida como variação de Nijmegen ou teste de Bethesda modificado.

Por definição, uma unidade Bethesda (UB) representa o inverso da diluição do plasma que neutraliza 50% de FVIII no plasma normal (Lavigne-Lissalde et al, 2005) e resultados acima de 5UB/mL, em qualquer momento da vida do indivíduo, são considerados de alta resposta (Verbruggen et al, 1995; White et al, 2001). Os altos títulos de inibidores podem ser mantidos por vários meses/anos, mesmo se o paciente interromper a exposição ao FVIII. Alternativamente, o sistema imune pode ser estimulado de modo que a resposta à exposição ao fator é menor e os títulos permanecem abaixo de 5UB/mL, caracterizando um quadro de inibidor de baixa resposta (Verbruggen et al, 1995; White et al, 2001). As características do título de inibidores podem mudar ao longo do tempo e, ainda que raramente, pode ocorrer seu desaparecimento espontâneo principalmente quando os títulos são inferiores a 10UB/mL (Caram, et al, 2011; DiMichele, 2000).

O tratamento de hemorragias em pacientes com HA que desenvolveram inibidores requer o uso de altas doses de concentrado de FVIII ou de agentes *bypassing*, que são produtos com capacidade de gerar trombina independente da via do FVIII. Estes são o concentrado de complexo protrombínico ativado (CPPa) e o fator VII ativado recombinante (rFVIIa). Ambos são disponibilizados pelo Ministério da Saúde para o tratamento de pacientes com hemofilia que desenvolveram inibidores e que não respondem à dose alta de FVIII (inibidores ativos). Esses produtos são de alto custo e não apresentam a mesma eficácia hemostática do tratamento com o fator deficiente.

Quando pacientes desenvolvem inibidores persistentes (acima de seis meses) de alta resposta, requerendo o uso de agentes *bypassing*, a indução de imunotolerância (IT) é indicada. A IT é o único tratamento disponível capaz de erradicar 60%-80% dos casos de inibidor em HA (Lenk & ITT Study Group, 1999). A IT baseia-se na administração frequente de altas (100 UI/Kg a 300 UI/kg diariamente) ou baixas (25-50 UI/Kg três vezes na semana) doses de concentrado de FVIII. Apesar de

ser um tratamento longo, de alto custo, com necessidade de infusões endovenosas frequentes e sem garantia de sucesso, o protocolo de IT é uma importante ferramenta no tratamento dos pacientes com HA que desenvolvem inibidores persistentes e de alta resposta.

1.4. Fatores de risco para desenvolvimento de inibidor em hemofilia congênita

Atualmente, os fatores de risco que resultam no desenvolvimento de inibidor em hemofilia são considerados de origem multifatorial e podem ser divididos em genéticos e não-genéticos. Entretanto, o motivo pelo qual apenas 10%-30% dos pacientes com HA (Dimichele, 2002; Gouw et al, 2007a) desenvolvem essa resposta imunológica ainda é desconhecido (Ehrenforth et al, 1992). A prevalência dos inibidores é de 5% a 7% e 12% a 13% em todos os pacientes com HA e naqueles com HA grave, respectivamente.

Os principais fatores de risco descritos envolvem o tipo e a gravidade da hemofilia, a mutação associada à doença e a intensidade da infusão com concentrados de fator (Gouw et al, 2007b; 2007c; Ter avest et al, 2008).

Pacientes cuja primeira exposição ao fator deficiente ocorre de forma intensa, como nos casos de cirurgias ou sangramentos graves, parecem apresentar maior risco de desenvolver inibidor (Gouw et al, 2013a). Gouw e colaboradores (2013a) descreveram que pacientes que tiveram a primeira exposição ao concentrado de fator durante 3 a 5 dias consecutivos apresentaram um risco 40% maior de desenvolver inibidores (*hazard ratios* ajustado [*aHR*], 1,4; intervalo de confiança [IC] 95%, 0,87-2,3]. Esse risco aumenta quando a primeira exposição tem duração entre 5 a 10 dias (*aHR*, 2,0; IC 95%, 1,3-3,0) (Gouw et al, 2013a). Por outro lado, pacientes em profilaxia regular apresentam uma redução de até 42% no risco de desenvolvimento de inibidor de alto título quando comparados a pacientes tratados sob demanda (HR, 0,58; IC 95%, 0,36-0,92) (Gouw et al, 2007a). Em 2008, Ter Avest e colaboradores desenvolveram um escore de risco preditivo para inibidor que inclui histórico familiar de inibidor, alterações genéticas consideradas de alto risco e intensidade do tratamento na primeira exposição (Ter Avest et al, 2008).

Com relação aos fatores de risco genéticos, estudos sugerem associação entre determinadas mutações em F8 e a formação de inibidores. Mutações nulas que resultam na ausência ou quase ausência de expressão da proteína, tais como inversões dos *íntrons* 1 e 22, grandes deleções e mutações *missense* que codificam os domínios A2, C1 e C2 do FVIII (Oldenburg et al, 2002), apresentam um risco 7 a 10 vezes maior para desenvolvimento de inibidores quando comparadas a pequenas deleções, mutações de sentido trocado e em sítio de processamento, consideradas de baixo risco para inibidor (Schwaab et al, 1995). Alterações específicas em alguns resíduos, tais como Arg593Cys, Arg2150His e Trp2229Cys estão associadas à presença de anticorpos anti-FVIII em

pacientes com HA leve. Nesses pacientes, a presença de mutações com sentido trocado nos domínios A1–A2 e C1–C2 do FVIII confere um risco até 50% maior para o desenvolvimento de inibidor (Oldenburg et al, 2002).

Até o momento, o estudo genômico mais completo do fenótipo de inibidores em HA utilizou dados de Whole Exome Sequencing (WES) em 26 pacientes europeus, e revelou novas mutações raras e deletérias em genes imunorreguladores (Gorski, et al., 2016). Dentre elas, o polimorfismo rs3754689, envolvendo a alteração de uma base T no gene da Lactase (LCT), localizada em uma região de haplótipos altamente conservada no cromossomo 2q21, foi observada. Gorski (2016) e colaboradores demonstraram que este polimorfismo está relacionado com um fator de proteção contra o desenvolvimento de inibidores em pacientes com hemofilia (*odds ratio* 0,56; intervalo de confiança 95%, 0,33-0,94). Embora o gene da lactase não pareça apresentar uma relação causal com o fenótipo de inibidores, o SNP encontra-se em alto desequilíbrio de ligação com importantes genes como *R3HDM1* (locus de susceptibilidade para os distúrbios autoimunes esclerose sistêmica e lúpus eritematoso sistêmico), *MCM6* (rs4988235, envolvido na atividade transcricional do promotor de *LCT*), e *UBXN4* (proteína de degradação associada ao retículo endoplasmático, uma via potencialmente envolvida na apresentação de peptídeos de FVIII a células auxiliares T CD4⁺).

Negros e hispânicos apresentaram, respectivamente, 2,4 (IC 95%, 1,2-4,5) e 2,5 (IC 95% 1,1–5,9) vezes mais risco de desenvolver inibidor quando comparados a caucasianos, o que sugere que a etnia do paciente pode influenciar no desenvolvimento desses anticorpos (Gouw et al, 2007). Viel e colaboradores (2009) descreveram que, de acordo com o haplótipo, seis proteínas (FVIII) diferentes podem ser codificadas (H1, H2, H3, H4, H5 e H6), sendo que três dessas proteínas (H3, H4 e H5) são encontradas apenas na população negra Norte-Americana (Viel et al, 2009). O FVIII recombinante comumente possui sua sequência de aminoácidos compatível com os haplótipos H1 e H2, presentes em todos os grupos étnicos. Dessa forma, acredita-se que alguns haplótipos de F8 mais frequentes na população negra codifiquem uma proteína diferente da presente nos concentrados de FVIII de origem recombinante, principalmente H3 e H4, podendo então, estimular mais facilmente uma resposta imunológica específica. Assim, diferenças entre o FVIII infundido e o FVIII sintetizado pelo organismo do paciente poderiam contribuir para uma maior incidência de inibidores nesses pacientes (Gunasekera et al, 2015). Santos e colaboradores (2009) também observaram maior prevalência de inibidor na população negra brasileira. Entretanto, os autores não encontraram associação entre o desenvolvimento de inibidor e o haplótipo de F8 (Santos et al, 2009).

Alguns estudos sugerem que polimorfismos em genes relacionados à resposta imune, tais como o TNF-alfa (Astermark et al, 2006; Pavlova et al, 2009; Pinto et al, 2012), HLA (Hay et al, 1997; Oldenburg et al, 2000), IL-1 e IL10 (Astermark et al, 2006; Chaves et al, 2010a; Lozier et al, 2011; Lu et

al, 2012; Pavlova et al, 2009; Pinto et al, 2012) podem estar relacionados ao desenvolvimento de inibidores. Astermark e colaboradores (2006) e Pavlova e colaboradores (2009) descreveram que a presença de um polimorfismo na região promotora (-1082 A/G) do gene da IL-10, relacionado com o aumento da produção da citocina, está relacionado ao desenvolvimento de inibidores. Pavlova e colaboradores (2009) também reportaram que o polimorfismo A-308G no gene produtor de TNF-alfa foi encontrado com maior frequência em pacientes com hemofilia e inibidor, quando comparado a pacientes sem inibidor (OR 1,80; IC 95% 1,13-2,86) (Pavlova et al, 2009). Entretanto, esses estudos analisaram exclusivamente o genótipo, sem avaliação da expressão do RNA mensageiro ou dos níveis plasmáticos da citocina (Astermark et al, 2006; Pavlova et al, 2009). Por outro lado, um estudo em modelo animal encontrou evidências de que o aumento na produção de IL-10 por células dendríticas parece estar relacionado com a redução do risco de desenvolvimento de inibidores em hemofilia, induzindo o desenvolvimento de tolerância ao FVIII (Quadura et al, 2008). Ainda, Bafunno e colaboradores (2009) não encontraram associação entre polimorfismos no gene que codifica a IL-10 e o desenvolvimento de inibidor. Assim, o papel do genótipo da IL-10 no desenvolvimento de inibidores em hemofilia ainda é controverso.

Em 2010, Chaves e colaboradores realizaram a análise de polimorfismos nos genes das citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e TNF-alfa em 60 pacientes com HA, atendidos na Fundação HEMOMINAS, em Belo Horizonte, Minas Gerais, dos quais 30 apresentavam inibidor. O estudo não encontrou associação do desenvolvimento de inibidor com a presença dos polimorfismos G/C 3'UTR, C703T e A-308G (rs1800629) avaliados nos genes IL-4, IL-5 e TNF-alfa, respectivamente. Por outro lado, portadores do haplótipo GCC/ACC, presente no gene de IL-10, apresentaram um risco 5,8 vezes maior de desenvolvimento de inibidor (Chaves et al, 2010a).

Entre os fatores de risco não genéticos, o tipo de fator utilizado é o mais debatido. Alguns estudos demonstraram que os concentrados de FVIII recombinante estão associados a um maior risco de desenvolvimento de inibidores (Calvez et al, 2014; Collins et al, 2014; Peyvandi et al, 2016; Calvez et al, 2018) em comparação aos derivados de plasma (Iorio et al, 2010). Entretanto, o estudo RODIN não encontrou esta associação (Gouw et al, 2013). O RODIN é um estudo de coorte internacional, que incluiu 576 pacientes previamente não tratados (do inglês, *previously untreated patients* - PUPs) e os acompanhou até o desenvolvimento de inibidor ou até 75 DE do tratamento sem inibidor (Gouw et al, 2013). Este estudo não encontrou diferença na incidência de inibidores em pacientes em uso de FVIII plasmático e recombinante (Gouw et al, 2013). Entretanto, ao avaliar o risco entre os diferentes concentrados de fator recombinantes, um tipo de concentrado de FVIII específico de segunda geração (Kogenate®FS, fabricado por Bayer HealthyCare, Barmen, Alemanha) esteve associado ao aumento de 60% no risco de desenvolvimento de inibidor em comparação com

outros produtos recombinantes (HR, 1,60; IC 95%, 1,08 - 2,37) (Gouw et al, 2013). Dois estudos de coorte retrospectivos subsequentes com 395 pacientes franceses e 407 ingleses encontraram um risco 75% (HR, 1,75; IC 95%, 1,11-2,76) (Calvez et al, 2014) e 55% (HR, 1,55; IC 95%, 0,97 - 2,49) (Collins et al, 2014) para o desenvolvimento de inibidores entre pacientes em uso do mesmo FVIII recombinante de segunda geração, Kogenate®FS (Bayer HealthyCare, Barmen, Alemanha), quando comparado a concentrados de fator derivados do plasma. Recentemente, um estudo de coorte francês avaliou a incidência de inibidores em pacientes previamente não tratados com HA grave em uso de concentrado de FVIII plasmático (Factane®; LFB, Paris, França) (n = 131), comparada com grupos que foram tratados com duas marcas diferentes de concentrados de FVIII recombinante de segunda e terceira geração, Kogenate®FS (Bayer HealthyCare, Barmen, Alemanha) (n = 127) e ADVATE® (Shire, Lexington) (n = 137), respectivamente (Calvez et al, 2018). O trabalho revelou que a incidência acumulada de inibidores de alto título foi de 12,7% (IC 95%, 7,7-20,6) com uso de Factane®, 20,4% (IC 95%, 14,0-29,1) com uso de ADVATE® e 31,6% (IC 95%, 23,5-41,7) nos pacientes tratados com Kogenate®FS (Bayer HealthyCare, Barmen, Alemanha) (Calvez et al, 2018). Estes resultados sugerem que a imunogenicidade pode não ser a mesma para diferentes concentrados de FVIII. Na literatura, estimativas de imunogenicidade por produto têm precisão limitada, devido ao número reduzido de pacientes tratados unicamente com cada produto.

O estudo SIPPET foi o primeiro ensaio clínico randomizado cujo objetivo foi comparar o risco de desenvolvimento de inibidores entre concentrados de FVIII de acordo com sua origem (Peyvandi et al, 2016). Após ajuste para diversos fatores de confusão, este estudo reportou a incidência acumulada de 44,5% (IC 95%, 34,7-54,3) *versus* 26,8% (IC 95%, 18,3-35,2) para todos os inibidores e 28,4% (IC 95%, 19,6-37,2) *versus* 18,6% (IC 95%, 11,1-26,9) para inibidores de alto título nos pacientes em uso de concentrados de fator recombinante e plasmático, respectivamente. Este estudo concluiu que o risco de desenvolvimento de inibidor foi 87% maior em pacientes tratados com FVIII recombinante (HR 1,87; IC 95%, 1,17 - 2,96) (Peyvandi et al, 2016).

O Estudo SIPPET fez, ainda, uma análise das alterações genéticas em 235 pacientes incluídos no estudo (Rosendaal et al, 2017). Rosendaal e colaboradores (2017) relacionaram o tipo de concentrado de fator utilizado (plasmático ou recombinante) com o desenvolvimento de inibidores em pacientes que apresentavam mutações de alto risco (Inversões dos *introns 1 e 22*, mutações sem sentido, *frameshift* e grandes deleções) e em pacientes com mutações de baixo risco (polimorfismos, mutações *missense* e no sítio de *splice*). Este estudo descreveu maiores taxas de desenvolvimento de inibidor nos pacientes com mutações de baixo risco tratados com concentrados de FVIII recombinante quando comparados aos pacientes de baixo risco tratados com concentrados de FVIII derivado de plasma (Rosendaal et al, 2017).

Os motivos para a diferença de imunogenicidade de concentrados de fator plasmáticos versus recombinantes e entre os próprios recombinantes não são conhecidos. Suspeita-se que diferentes passos na purificação da proteína, variações nas modificações pós-traducionais e a inativação viral possam resultar em alterações nas propriedades físico-químicas da molécula de FVIII aumentando a sua imunogenicidade (Lai et al, 2017). Ainda, uma vez que o fator de von Willebrand (FvW) exerce influência conhecida sobre a meia-vida do FVIII, através de ligação ao domínio C2, acredita-se que o FvW possa modular a imunogenicidade do FVIII. Em 2012, Delignat e colaboradores avaliaram dois grupos de camundongos hemofílicos, sendo que o grupo controle recebeu doses de concentrado de FVIII recombinante puro e o grupo caso recebeu doses de concentrado de FVIII recombinante associado ao FvW. Foi observada menor produção de anticorpo IgG anti-FVIII no grupo tratado com FVIII e FvW em comparação ao grupo controle ($p = 0,03$) (Delignat et al, 2012). Outro estudo realizou a caracterização dos peptídeos de FVIII apresentados via MHC II extraídos de culturas celulares estimuladas com FVIII ou com o complexo FVIII/FvW e descreveu que a presença do FvW é capaz de alterar o repertório e a apresentação dos antígenos do FVIII (Sorvilo et al, 2016). Uma das hipóteses para explicar esses achados é que a ligação com o FvW seria capaz de diminuir a endocitose do FVIII pelas células apresentadoras de antígenos (Dasgupta et al, 2007). Assim, a ausência ou baixa concentração de FvW no concentrado de FVIII parece torná-lo mais imunogênico (Behrmann et al, 2002).

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

1.5. Imunologia na hemofilia

Tanto os linfócitos T CD4 quanto os T CD8 ativados são importantes na modulação da resposta imune dos inibidores em hemofilia devido à produção diferencial de citocinas, induzida pela infusão da proteína exógena (FVIII), que não é reconhecida como própria pelo organismo (Lollar, 2004; White et al, 2005; Chaves et al, 2008). No contexto da hemofilia A, acredita-se que o FVIII exógeno infundido seja endocitado por células dendríticas, que então clivam a proteína em pequenos peptídeos de 9-16 aminoácidos. Esses fragmentos se ligam às moléculas de HLA de classe II e são transportados para a superfície da célula, onde podem ser reconhecidos pelos linfócitos T CD4 (Stern et al, 1994). Em adição, alguns fragmentos também podem ser apresentados aos linfócitos T CD8 via HLA de classe I. Essas interações resultam na expansão clonal do linfócito T ativo anti-FVIII

que, ao interagir com um linfócito B, também específico para FVIII, secreta citocinas e induz a formação de anticorpos (IgG) inibidores de FVIII (Lollar, 2004; Chaves et al, 2008) (Figura 1).

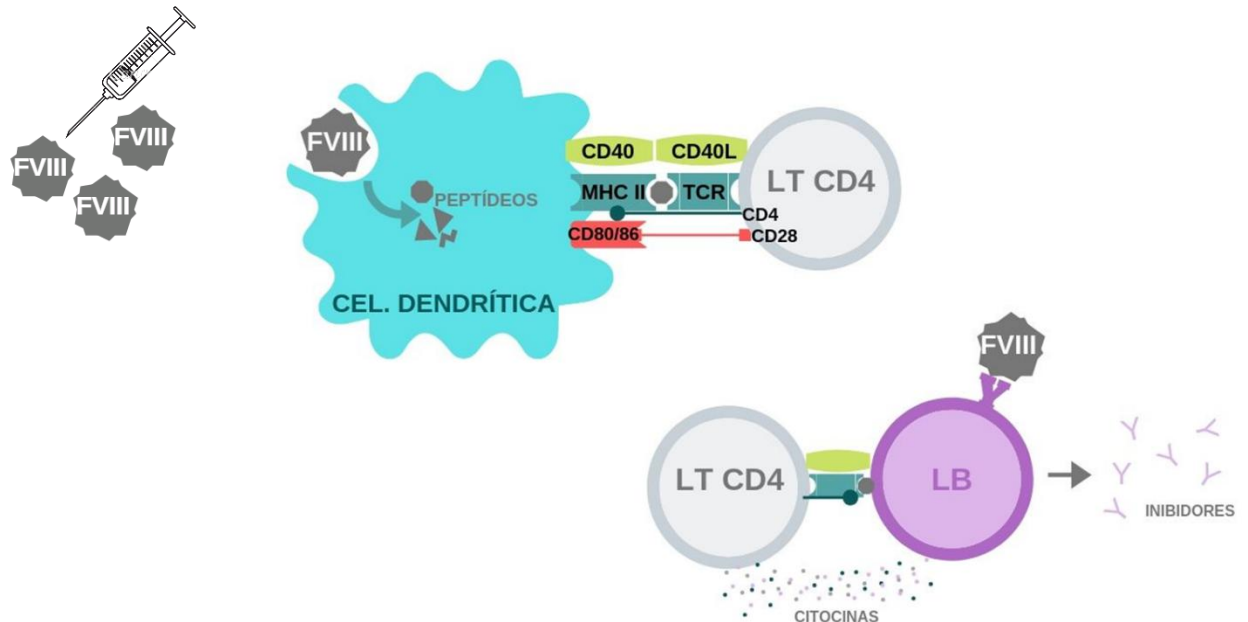


Figura 1. Esquema ilustrativo da resposta imunológica à infusão de fator VIII em humanos. O FVIII infundido circula no sangue. No baço, células dendríticas endocitam e degradam o FVIII em pequenos peptídeos. Esses peptídeos se ligam às moléculas de HLA de classe II, onde podem ser reconhecidas pelos linfócitos T CD4 (LT CD4) via receptor de célula T (TCR). As moléculas co-estimulatórias envolvidas neste processo incluem CD40 e CD86 na superfície das células dendríticas. Essas moléculas são reconhecidas, respectivamente, por CD40 ligante (CD40L) e CD28 na superfície dos LT CD4. Após sua ativação, os LT migram para os folículos de linfócitos B (LB) no baço, interagem com essas células, novamente pelo reconhecimento do complexo peptídeo-HLA-II, via TCR. Mais uma vez, sinais co-estimulatórios são necessários para promover a completa ativação dos linfócitos B. Além disso, a liberação de citocinas pelos LT e LB induz a proliferação dos LB, que produzirão inibidores. Fonte: Jardim et al, 2020 RPTH.

Células Th1 e Th2 secretam citocinas que favorecem o crescimento e diferenciação dos linfócitos B e a síntese de anticorpos (Reding et al, 2002). As citocinas Th1 induzem a síntese de subclasses como IgG1 e IgG2 e as citocinas Th2 promovem a síntese de subclasses como IgG4 (Reding et al, 2002).

Os inibidores do FVIII são principalmente da subclasse IgG4. No entanto, outras subclasses, especialmente IgG1, também são observadas, sugerindo que a formação de inibidores possa envolver uma associação entre respostas Th1 e Th2 (Lollar et al, 2004). Foi demonstrado que a distribuição das subclasses de anticorpos contra o FVIII difere entre coortes de pacientes com HA congênita e indivíduos sem hemofilia. Anticorpos contra o FVIII da subclasse IgG1, IgM e IgA foram os mais predominantes encontrados em indivíduos saudáveis (Whelan et al, 2012). A produção de IgG1 sem atividade inibitória foi observada em pacientes com HA sem inibidores (Hu et al, 2007; Chaves et

al, 2010). No entanto, IgG4 é predominantemente encontrada em pacientes com HA e inibidor, especialmente naqueles com inibidores de alto título (Lollar et al 2004; Whelan et al, 2012; Montalvão et al, 2015; Hofbauer et al, 2016). Hofbauer e colaboradores (2016) relataram que níveis de IgG1 e IgG4 de alta afinidade foram detectáveis antes da primeira dosagem de inibidor positivo por Bethesda. Ainda, este trabalho levantou a hipótese de que uma atividade inibitória pode se iniciar anteriormente ao tratamento de reposição com concentrado de FVIII (Hofbauer et al, 2016).

Ao avaliar o perfil imunológico em dois grupos de pacientes com hemofilia em um estudo transversal, Chaves e colaboradores (2010b) constataram que pacientes sem inibidor apresentaram um perfil de resposta pró-inflamatório mediado por células T, provavelmente induzindo a síntese de anticorpos IgG1 anti-FVIII sem atividade inibitória (Chaves et al, 2010b). No grupo de pacientes com inibidor foi observado um perfil anti-inflamatório/regulatório, mediado por neutrófilos e monócitos, com altos níveis de IL-5 e IL-10 e baixos níveis de IL-2, IL-4, IFN-gama e TNF-alfa, provavelmente induzindo os linfócitos B a produzir anticorpos anti-FVIII da subclasse IgG4 (Chaves et al, 2010b).

Recentemente, nosso grupo descreveu que antes do início do tratamento com FVIII, pacientes com HA apresentam níveis elevados de micropartículas derivadas de plaquetas, leucócitos totais, linfócitos T, neutrófilos, monócitos e eritrócitos, quimiocina IL-8 e das citocinas IL-6, TNF, IL-4, IL-10 e IL-17 quando comparados ao grupo de controles sem hemofilia (Jardim et al, 2017). A nossa hipótese é de que a presença deste perfil caracterizado por aumento de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias em pacientes com HA, seja resultante de microhemorragias e/ou sangramentos subclínicos, que poderiam induzir a ativação da coagulação e inflamação (Jardim et al, 2017).

O perfil de citocinas e quimiocinas em camundongos hemofílicos que desenvolveram inibidor após terapia gênica foi avaliado por Sun e colaboradores (2018). Os resultados sugerem que baixos níveis de TGF-beta, associados a altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, IL-12 e TNF-alfa, podem favorecer o aparecimento de uma resposta imunológica contra o FVIII (Sun et al, 2018). Entretanto, ainda não temos conhecimento de estudos que tenham avaliado o perfil imunológico de pacientes com HA antes do início do tratamento com concentrado de fator e o tenha comparado após o desenvolvimento de inibidor ou após 75 DE em pacientes que não o desenvolveram.

Uma avaliação do perfil imunológico em pacientes com HA previamente não tratados pode contribuir para um melhor entendimento de como os biomarcadores imunológicos se comportam antes da exposição ao FVIII exógeno. Isso pode ser importante para entender por que alguns pacientes desenvolvem inibidores e outros não.

1.6. Mortalidade dos pacientes com hemofilia

A história da mortalidade em hemofilia tem sido fortemente influenciada pela evolução dos tratamentos disponíveis. Com o surgimento dos produtos derivados de plasma, nos anos 1960, houve redução dos episódios hemorrágicos graves nos pacientes e consequente aumento da expectativa de vida que, até então, era inferior a 30 anos (Larsson SA, 1985). Entretanto, a partir de 1980, doenças infecciosas transmitidas por esses produtos, que ainda não passavam por processo de inativação viral, passaram a acometer os pacientes (Walker e Julian, 1998). O vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV) se tornou a principal causa de morte entre os pacientes com hemofilia até o final dos anos 1990 (Chorba et al, 2001; Reitter et al, 2009) e o vírus da hepatite C (HCV) chegou a acometer mais da metade dos pacientes tratados com concentrados de fator derivados do plasma antes de 1992 (Plug et al, 2006). No Brasil, 6,5% e 34,9% da população de pacientes com hemofilia entre 2005 e 2007 apresentava testes positivos para HIV e HCV, respectivamente (Rezende et al, 2009).

Com a melhoria das técnicas de detecção dos agentes infecciosos, seleção rigorosa de doadores de sangue e advento das técnicas de inativação viral no final da década de 1980, as mortes decorrentes da infecção por HIV foram gradativamente reduzidas até não serem mais diretamente associadas à doença (Arnold et al, 2006; Reitter et al, 2009; Schramm et al, 2013). A infecção por HCV nos pacientes com hemofilia ainda observada nos dias atuais é consequência da contaminação no passado. Embora o advento das novas drogas antivirais, como Sofosbuvir, Simeprevir e Daclatasvir tenha erradicado aproximadamente 95% dos casos de infecção por HCV nos últimos cinco anos, doenças hepáticas relacionadas a esta infecção ainda são uma importante causa de morbimortalidade nos pacientes com hemofilia até os dias atuais (Darby *et al*, 2007; Donald *et al*, 2006; Tuinenburg et al, 2009). Ainda, pacientes que possuem co-infecção com HIV e HCV apresentam pior prognóstico, com evolução mais rápida das complicações hepáticas (Donald et al, 2006). É importante ressaltar que desde 1995 não há relato de nenhuma infecção por HIV ou hepatites decorrentes de uso de concentrados de fator de origem plasmática, o que sustenta a alta segurança transfusional destes produtos (Reitter et al, 2009; Schramm et al, 2013).

Apesar do grande avanço no tratamento da hemofilia nos últimos 40 anos, a mortalidade dos pacientes com hemofilia em países desenvolvidos é superior à mortalidade da população geral masculina, sendo 2,6 vezes maior na Grécia e 2,3 vezes maior na Holanda (Koumbarelis, 1994; Plug et al, 2006). A análise de indivíduos não infectados por HIV e HCV demonstra que, se retirarmos os efeitos relacionados às doenças infecciosas, as complicações decorrentes de sangramentos ainda são a principal causa de morte e redução na expectativa de vida dos pacientes com hemofilia (Darby et al, 2007; Tuinenburg et al, 2008; Reitter et al, 2009; Chang et al, 2014). Ainda, a taxa de mortalidade em indivíduos com a forma grave da doença é 5,1 vezes maior quando comparada aos pacientes com

hemofilia moderada ou leve na Holanda (Plug et al, 2006) e aproximadamente duas vezes maior no Reino Unido (1,81; 95% IC 1,54 - 2,16) (Darby et al, 2007).

Dos pacientes não infectados por HIV no Reino Unido, 44% das mortes ocorreram devido a hemorragias, enquanto 16% foram decorrentes de doenças hepáticas (Darby et al, 2006). Na Suécia, entre 1960 e 1980, hemorragia intracraniana foi causa da morte em 38% dos pacientes com hemofilia grave, enquanto, na Itália, no período entre 1980 e 2007, esta proporção foi de 20,2% (Larsson et al, 1983; Tagliferri et al, 2010). Witmer e colaboradores (2015) relatam que nos Estados Unidos, 28,4% dos pacientes pediátricos que faleceram por hemorragia intracraniana apresentavam inibidor positivo no período entre 2002 e 2011. Na Áustria, 61,9% dos pacientes com HA e HB e inibidor faleceram no período entre 1983 e 2006 (Reitter et al, 2009). A expectativa de vida da população com hemofilia do Reino Unido era 63 anos em 1999, 52 anos para os pacientes holandeses em 2006 e 56 anos na Suécia em 2008 (Plug et al, 2007, Darby et al, 2006).

Com a melhora da expectativa de vida dos pacientes com hemofilia no decorrer dos anos, complicações de saúde normalmente associadas ao envelhecimento, como doenças cardiovasculares e câncer, passaram a ser observadas nesta população (Tuinenburg et al, 2008). No entanto, apesar do aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares a partir dos anos 2000, essa taxa permanece inferior nos pacientes com hemofilia quando comparada ao esperado na população masculina geral, fazendo com que a hemofilia grave seja considerada por alguns autores como fator de proteção para doença cardiovascular (Koumbarelis et al, 1994; Tuinenburg et al, 2008; Darby et al, 2007).

Apesar de muitos estudos terem abordado a mortalidade em hemofilia em diferentes países, até onde sabemos, estudos que investigam a mortalidade dos pacientes com hemofilia no Brasil ainda não foram publicados.

2.1. Objetivo geral

Avaliar os aspectos epidemiológicos e clínicos da hemofilia e suas complicações.

2.2. Objetivos específicos

- Artigo 1 - Avaliar a incidência acumulada de desenvolvimento de inibidores em pacientes previamente não tratados/minimamente tratados com hemofilia A congênita;
- Artigo 2 - Avaliar a taxa de mortalidade padronizada em pacientes com hemofilia no Brasil em comparação com a população geral masculina;
- Artigo 3 - Avaliar a relação da variante *rs3754689* no gene da Lactase com o desenvolvimento de inibidores em pacientes com hemofilia A.

3.1. O estudo HEMFIL

3.1.1. Desenho do estudo

O Estudo HEMFIL é um estudo de coorte, prospectivo, que tem como objetivo avaliar fatores clínicos, imunológicos e genéticos relacionados ao desenvolvimento de inibidores em hemofilia (Figura 1). A denominação do seu nome deu-se em homenagem ao cartunista Henfil, que, junto com mais dois irmãos, tinha hemofilia A e faleceu em decorrência de complicações da doença. Para tal uso, obteve-se aprovação do seu filho (Ivam Cosenza de Souza), que dirige a Fundação Henfil. O mesmo permitiu o uso da figura da graúna como logo do Estudo HEMFIL, que foi desenhada por um ilustrador especificamente para o estudo (Anexo 1).

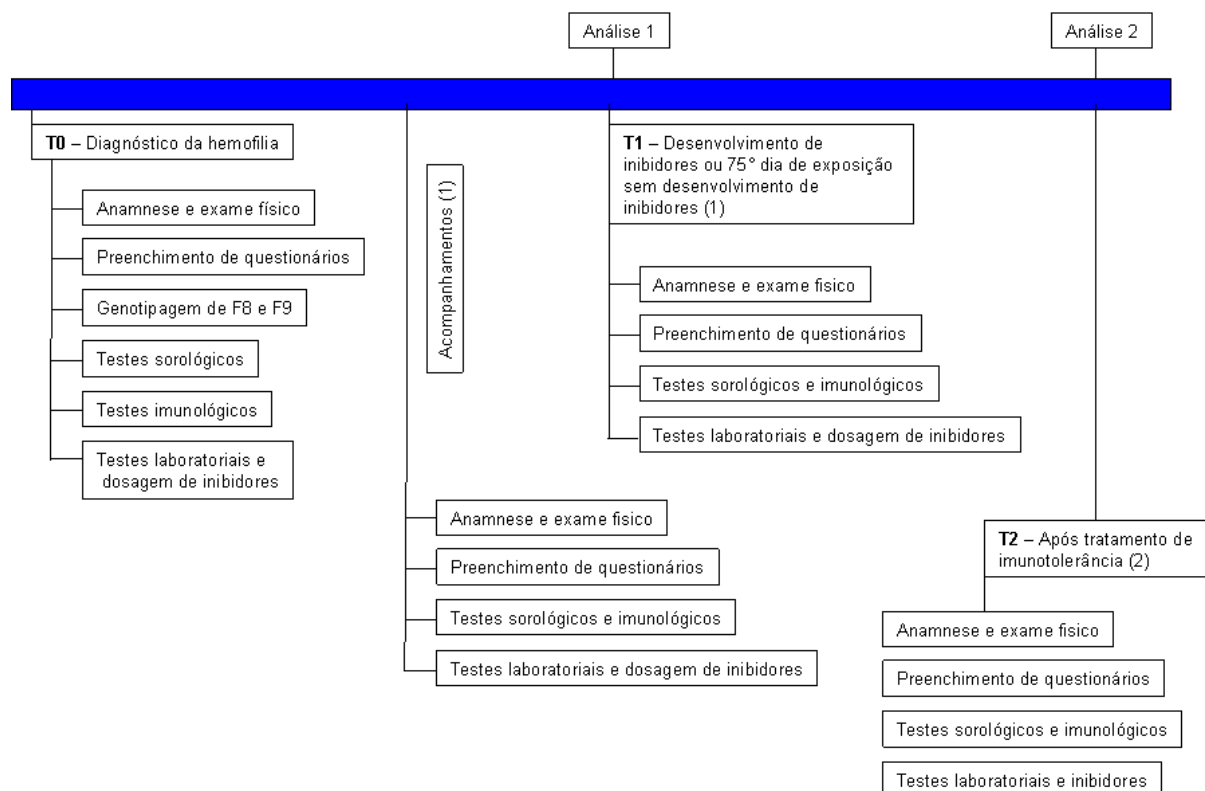


Figura 2. Delineamento do estudo original.

3.1.2 Locais do estudo

Os participantes do estudo são diagnosticados e acompanhados nos hemocentros do Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Curitiba (PR), Florianópolis (SC) e Vitória (ES). Nesses locais também são realizados os exames de rotina dos pacientes. As dosagens dos biomarcadores imunológicos são realizadas no laboratório do Serviço de Pesquisa do Hemocentro de Belo Horizonte,

Fundação HEMOMINAS. As análises genéticas são realizadas no Laboratório de Hematologia Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG.

3.1.3 População do estudo

Os participantes da pesquisa são pacientes atendidos no Hemocentro de Belo Horizonte, Fundação HEMOMINAS, Hemocentro do Paraná (HEMEPAR), Hemocentro do Espírito Santo (HEMOES), Hemocentro de Santa Catarina (HEMOSC) e Hemocentro do Rio de Janeiro (HEMORIO). Os pacientes são incluídos consecutivamente após confirmação do diagnóstico de hemofilia A ou hemofilia B, sempre que possível antes da primeira infusão de qualquer hemocomponente/hemoderivado (PUPs).

Após inclusão, os pacientes são encaminhados à primeira avaliação clínica, para realização da anamnese e exame físico, além da coleta de dados sócio-demográficos, clínicos e laboratoriais através do preenchimento de formulários padronizados (Anexos 2-10). Todo participante do estudo recebe uma cartilha de acompanhamento (Anexo 11) para ser preenchida pelo familiar responsável no período de intervalo entre as consultas.

A partir do diagnóstico, os pacientes são acompanhados por meio de uma avaliação clínica periódica, com intervalos de no máximo 60 dias, realizada pelos médicos que atendem os pacientes nos hemocentros participantes. Essas avaliações incluem a realização de anamnese e exame físico, além do preenchimento dos formulários de acompanhamento padronizados (Anexos 2-10).

Cada participante possui um código de identificação que acompanha a amostra e todos os seus formulários/documentos do estudo. O número de identificação do paciente é composto pela sigla do Estado, acrescido de uma barra (/), seguida por um número sequencial de até três dígitos, de acordo com a sequência consecutiva da inclusão (Figura 2).

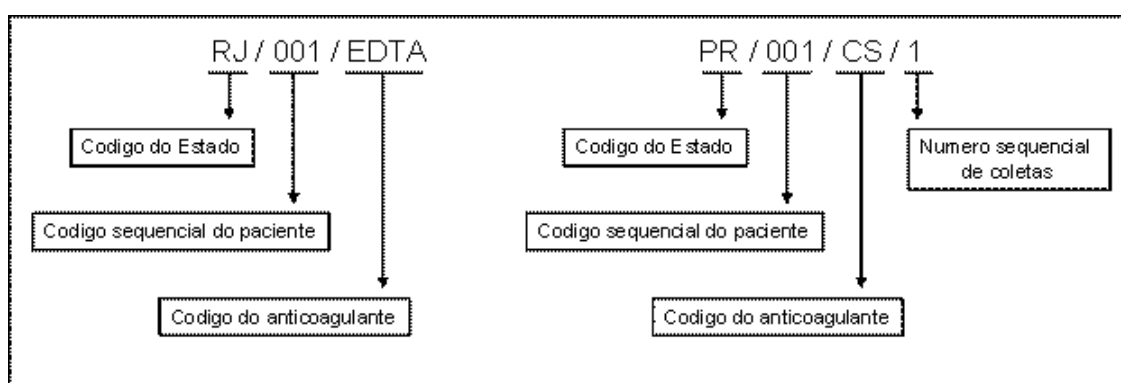


Figura 3. Orientação para identificação de amostras

3.1.4. Considerações éticas do estudo

O estudo foi aprovado pelos comitês de ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, Fundação HEMOMINAS, Fundação HEMOSC, Fundação HEMORIO, Fundação HEMEPAR e Fundação HEMOES (Anexo 12). Todos os responsáveis pelos pacientes assinam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 13 e 14).

3.1.5. Variáveis

As variáveis de interesse deste estudo são provenientes dos questionários do Estudo Rodin (Gouw et al, 2013a), gentilmente cedidos pela pesquisadora principal, Dra. Marijke van den Berg, da Universidade de Utrecht, Holanda. Os formulários foram integralmente traduzidos para a língua portuguesa e alguns dados de interesse do nosso grupo foram adicionados (Anexos 2-10).

De forma geral, foram coletadas variáveis como idade, peso, histórico familiar de hemofilia e inibidor, tipo e gravidade da hemofilia, dosagem de FVIII/FIX, uso de hemoderivados/hemocomponentes pela mãe durante o parto do paciente, aleitamento materno, monitoramento do inibidor, presença de outras doenças que podem interferir no prognóstico do paciente, entre outros. Também foram colhidas informações de fatores que possam influenciar o sistema imunológico do paciente, como infecções, alergias, vacinas e acompanhamento detalhado do paciente, através da descrição de qualquer sangramento que o paciente apresente, tipo de tratamento e alterações no tratamento prescrito.

As variáveis clínicas são coletadas pelos médicos hematologistas responsáveis pelo Letícia Lemos Jardim (LLJ) que verifica o preenchimento de todas as variáveis e faz a inserção no banco de dados do estudo. Caso seja constatado erro ou ausência de preenchimento, LLJ faz o contato com o hemocentro para correção.

3.1.6. Coleta de amostras

No momento do diagnóstico (T0) o sangue total do paciente foi coletado em três tubos contendo citrato de sódio 3,2%, que foram destinados à determinação da atividade coagulante dos fatores VIII e IX, pesquisa de inibidor e análise do perfil imunológico. Um tubo contendo EDTA também foi coletado e destinado à extração do DNA genômico.

A pesquisa de inibidor (triagem) foi realizada a cada 5-10 DE até 50 DE ao concentrado de fator deficiente, sendo rotineiramente realizada nos hemocentros, para todos os pacientes com hemofilia, de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde. Caso o teste de triagem tenha resultado positivo, foi realizada confirmação do diagnóstico de inibidor pela técnica de Bethesda modificada (T1/inibidor).

A presença de inibidor foi confirmada quando os títulos detectados pela técnica de Bethesda modificada foram $\geq 0,6$ Unidade Bethesda (BU)/mL em duas medições consecutivas, com duas a quatro semanas de intervalo, de acordo com a recomendação do Comitê Científico da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia (White et al, 2000). O inibidor de alta resposta é definido quando há persistência de títulos de inibidores ≥ 5 BU/mL em qualquer ocasião. O inibidor de baixa resposta é definido quando os títulos permanecem abaixo de 5UB/ml.

Os pacientes que desenvolveram inibidor e que preencheram os critérios de inclusão para o tratamento de imunotolerância (IT) continuaram sendo acompanhados pelo estudo e foram submetidos a nova coleta de sangue periférico, em tubo de citrato de sódio 3,2%, ao final da IT, independente de sucesso ou falha do tratamento (T2). Os pacientes que não desenvolveram inibidor até 75 DE, foram incluídos no tempo T1/75DE e tiveram, nesta ocasião, o sangue total coletado em novo tubo contendo citrato de sódio 3,2% (Figura 3).

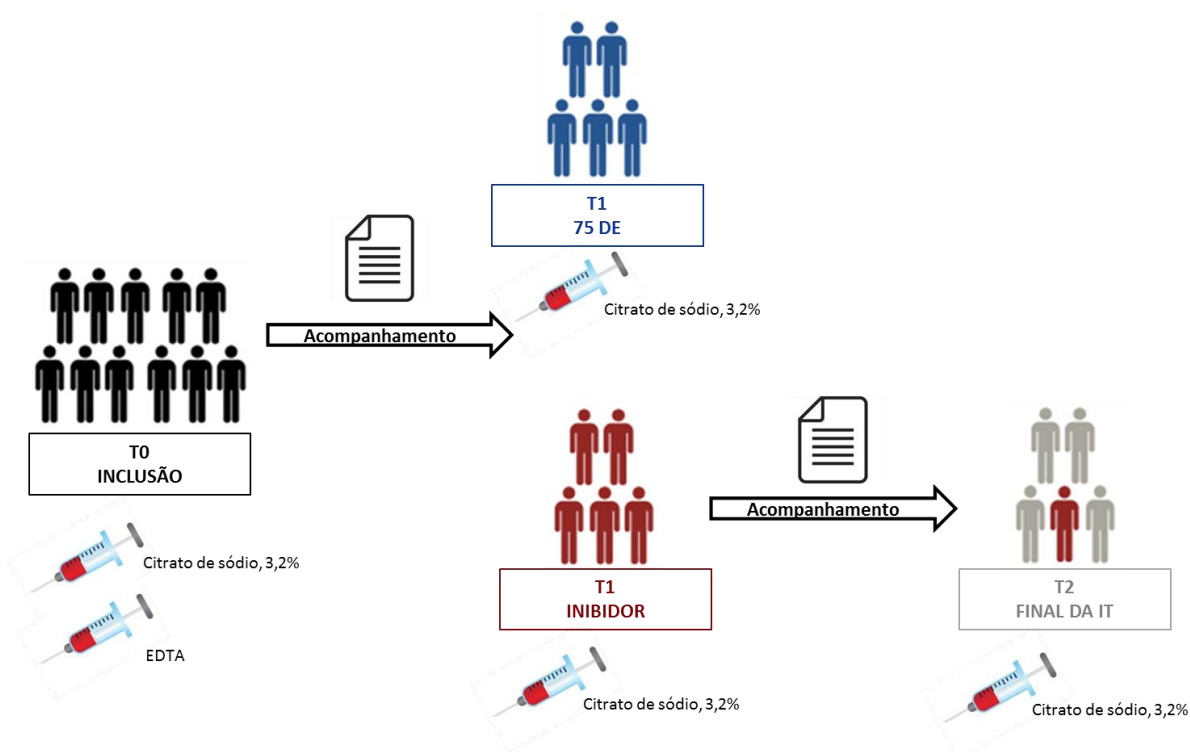


Figura 4. Tempos do estudo HEMFIL e coleta de amostras biológicas.

T0, momento da inclusão do paciente no estudo; T1, momento em que o inibidor é diagnosticado ou momento em que o paciente completa 75 dias de exposição ao tratamento sem inibidor; T2, final da imunotolerância.

Fatores que possam influenciar o perfil imunológico, tais como alergias, vacinação, infecções e inflamações, bem como medicamentos utilizados para o tratamento e qualquer condição correlata, foram identificados através de formulários padronizados (Anexos 2-10).

3.1.7. Testes laboratoriais

3.1.7.1. Determinação da atividade coagulante dos fatores VIII e IX

Para confirmação do diagnóstico de hemofilia e classificação do tipo (se A ou B) e gravidade (se leve, moderada ou grave), a mensuração da atividade coagulante dos fatores VIII e IX no plasma é mandatória. Para tal, 5 mL de sangue venoso foram coletados em citrato de sódio 3.2% e centrifugados a 3.500 rpm por 15 minutos, a 4°C, para separação do plasma. Alíquotas de 500 µL de plasma foram armazenadas em microtubos de polipropileno (tipo *eppendorf*) e congeladas imediatamente a -80°C até a realização dos testes, caso estes não sejam realizados imediatamente.

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

Os testes para a determinação da atividade coagulante dos fatores VIII e IX são rotineiramente realizados nos laboratórios de coagulação dos hemocentros (HEMOMINAS, HEMORIO, HEMEPAR, HEMOSC e HEMOES).

3.1.7.2. Investigação e quantificação de inibidores contra os fatores VIII e IX

3.1.7.2.1. Teste de triagem para inibidor

Em pacientes com hemofilia sem inibidor, ao realizar o teste de triagem, observa-se uma correção no tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) ao misturar o plasma do paciente com hemofilia a um plasma controle (*pool* de plasma normal). No entanto, quando o plasma do paciente apresenta algum inibidor, a correção do tempo de coagulação é pequena ou nenhuma.

Assim, o teste de triagem de inibidor ou teste de mistura consiste na mistura de um *pool* de plasma normal com o plasma do paciente na proporção 1:1, incubada por 2 horas a 37°C. Logo após, uma nova mistura do *pool* com o plasma do paciente é preparada também na proporção 1:1 (mistura imediata). O TTPa então é determinado no *pool* de plasma normal, no plasma do paciente, na mistura incubada e na mistura imediata, que é menos sensível para detectar inibidores anti-FVIII. Caso não haja correção do tempo de coagulação após a mistura, é sugestivo que haja presença de inibidor. Este teste é rotineiramente realizado nos laboratórios de coagulação dos hemocentros participantes, sendo recomendado rotineiramente para vigilância de inibidores em hemofilia.

3.1.7.2.2. Quantificação dos inibidores pela técnica de Bethesda modificada.

Quando o teste de triagem for positivo para a presença de inibidores, realiza-se a confirmação através da quantificação (titulação) do inibidor pela técnica de Bethesda modificada (Verbruggen et al, 1995).

Antes de iniciar o teste, as amostras de plasma dos pacientes foram diluídas em tampão imidazol (1:2), perfazendo um volume de 400µL. Os tubos foram homogeneizados e seguiu-se uma diluição seriada em tampão imidazol até 1:64. A solução controle é composta por um *pool* de plasma normal, também diluídos em tampão imidazol (1:1). Para o teste, 200µL de *pool* de plasma normal foram adicionados em todos os tubos e incubados em banho-maria a 37°C por 2 horas, sendo homogeneizados a cada 20 minutos. Após a incubação, os tubos foram colocados em gelo e a dosagem do FVIII foi realizada em todos os tubos e no controle, através da escolha aleatória de uma das diluições do plasma do paciente feita anteriormente, sendo esta a diluição em tampão imidazol na proporção de 1:10; foram transferidos 100µL dessa nova solução para cada canaleta do coagulômetro e então, foram adicionados 100µL de cefalina e 100µL de substrato deficiente em fator VIII. Pequenas esferas de metal foram colocadas no interior das canaletas das misturas e incubadas por 4 minutos a 37°C e então, 100µL de cloreto de cálcio 2,5mM foram adicionados. O tempo de coagulação foi medido e a porcentagem de FVIII residual das amostras foi determinada utilizando-se a curva padrão da atividade de FVIII.

Foi calculada a atividade residual de fator de cada diluição dividindo o valor da atividade do fator pelo valor da atividade do plasma controle e o resultado foi multiplicado por 100. Por fim, foi feita a conversão da atividade do FVIII residual em Unidades de Bethesda/mL.

3.1.7.3. Análise do perfil imunológico

Neste estudo, os níveis de imunoglobulinas (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM), as citocinas INF, TNF, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-17 e as quimiocinas IL-8, RANTES, MIG, MCP-1 e IP-10 plasmáticas

dos pacientes foram avaliados no momento da inclusão (T0), no momento do desfecho (T1) e, quando for o caso, após a IT (T2). Nos pacientes provenientes da Fundação HEMOMINAS também foi realizada a imunofenotipagem de leucócitos do sangue periférico, que requer sangue total fresco para sua realização. Por isso, essa técnica não foi realizada em pacientes provenientes dos demais hemocentros participantes.

3.1.7.4. Análise do perfil genético

3.1.7.4.1. Extração de DNA genômico.

A extração de DNA genômico foi realizada utilizando-se o *kit* comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), com metodologia baseada em coluna de sílica.

3.1.7.4.2. Caracterização molecular da hemofilia A

A análise das inversões dos *introns* 1 e 22 estão sendo realizadas em todos os pacientes com HA incluídos no estudo que apresentam FVIII:C < 2%, de acordo com protocolos já estabelecidos pelo nosso grupo e na literatura (Rossetti et al, 2008; Pio et al, 2011). Entretanto, para os pacientes com HA grave que não apresentam as inversões e todos os demais pacientes com HA, o sequenciamento detalhado do *F8* é imprescindível para detectar a alteração genética associada a hemofilia. No presente estudo, a cobertura completa de toda a região exônica do gene *F8* foi incluída em um painel customizado, junto com outros genes de interesse do estudo, para avaliação através da técnica de sequenciamento de nova geração.

Utilizamos a ferramenta *Design Studio* da empresa Illumina (Califórnia, EUA) para a customização das regiões de interesse e seleção do painel de enriquecimento para a construção das bibliotecas com *AmpliSeq Custom DNA Panel for Illumina*, de acordo com as especificações do fabricante. Utilizamos o sequenciador *Miseq*, de forma a gerar sequências com cobertura média de 200X. As análises dos dados genômicos obtidos estão sendo executadas utilizando-se as ferramentas disponíveis no *BaseSpace Suite* da Illumina.

O primeiro artigo com as análises genéticas, intitulado “*Variation of rs3754689 at lactase gene and inhibitors in admixed Brazilian patients with hemophilia A*”, publicado por Zucheratto LW et al, 2019, encontra-se nos resultados deste documento.

3.1.8. Desfecho

O desfecho primário do estudo foi determinado pelo desenvolvimento de qualquer inibidor, isto é, acima de 0,6 Unidades Bethesda (UB)/mL, detectado em pelo menos duas dosagens consecutivas, com intervalo de duas a quatro semanas, até 75 DE. O desfecho secundário foi o desenvolvimento de inibidor de alto título, definido através da detecção de inibidor clinicamente relevante, titulado acima de 5 UB/mL. O paciente que foi acompanhado até completar 75 DE e não desenvolveu inibidor foi considerado sem inibidor.

3.1.9. Análise

Artigo 1 - INHIBITOR INCIDENCE IN HAEMOPHILIA A UNDER EXCLUSIVE USE OF A THIRD-GENERATION RECOMBINANT FACTOR VIII CONCENTRATE: RESULTS OF THE HEMFIL COHORT STUDY

Jardim LL, van der Bom J, Brommonschenkel CC, Gouw SC, Rezende SM; on the behalf of the HEMFIL Study Group. Br J Haematol. 2019 Jul;186(1):152-155.

Para este artigo, foram incluídos 74 pacientes, com hemofilia moderada/severa (FVIII:C < 1,5%), do estudo Hemfil. Para as variáveis categóricas, o número de eventos e suas respectivas porcentagens foram calculados. Para as variáveis contínuas, a mediana e intervalo interquartil (Do inglês, *Interquartile range* - IQR) foram calculados.

O tempo até o desenvolvimento do inibidor foi calculado pela incidência acumulada de Kaplan-Meier, com os DE ao tratamento como variável “tempo”. Para esta análise, utilizamos o *software* Stata (STATA Corp LP, Texas, USA).

Artigo 2 – MORTALITY OF PATIENTS WITH HAEMOPHILIA IN BRAZIL: FIRST REPORT

Jardim LL, van der Bom JG, Caram-Deelder C, Gouw SC, Leal Cherchiglia M, Meireles Rezende S. Haemophilia. 2019 May;25(3):e146-e152.

Para este estudo, foram utilizados dados provenientes do Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM), da população brasileira, do sexo masculino, no período entre 2000 e 2014.

As causas de mortes de pacientes do sexo masculino com hemofilia congênita A e B foram identificadas de acordo com a 10ª Classificação Internacional de Doenças (CID-10). Os indivíduos falecidos com hemofilia foram selecionados a partir do SIM, quando ao menos um dos campos do atestado de óbito relatou o código CID-10 "D66", para hemofilia A (deficiência hereditária de fator VIII) ou "D67" para hemofilia B (deficiência hereditária de fator IX). As hemofilias A e B foram analisadas como um único grupo.

Para avaliar as comorbidades de pacientes falecidos com hemofilia, pesquisamos todos os códigos da CID-10 que haviam sido mencionados em qualquer um dos campos da certidão de óbito.

Os códigos mais frequentes estavam relacionados a HIV, hepatite, câncer, doenças renais, hemorragia e doenças cardiovasculares, como diabetes, hipertensão, angina, infarto do miocárdio e trombose. Em seguida, foi realizado um levantamento de todos os códigos relacionados a essas complicações, seguido de uma nova pesquisa no banco de dados do SIM. Entre os pacientes com hepatite, também procuramos códigos de doenças hepáticas, incluindo cirrose, insuficiência hepática, fibrose e câncer de fígado. Entre os pacientes com hemorragia, os códigos para hemorragia intracraniana foram especificamente pesquisados.

Pacientes com hemofilia adquirida ou outros defeitos de coagulação não foram incluídos na análise. Portanto, o código D68.4, "Deficiência adquirida do fator de coagulação", bem como todos os outros códigos derivados do CID D68, isto é, "Outros defeitos de coagulação", não foram analisados.

Para comparar a taxa de mortalidade geral na população de hemofilia com a população masculina brasileira, as taxas de mortalidade padronizadas (do inglês, standardized mortality ratio - SMRs) foram calculadas para o período total de 2000-2014. Para avaliar a tendência temporal das taxas de mortalidade na população de hemofilia, foram calculadas taxas de mortalidade ajustadas por idade em períodos de três anos: i) de 2000 a 2002; ii) de 2003 a 2005; iii) de 2006 a 2008; iv) de 2009 a 2011 e v) de 2012 a 2014, usando a distribuição etária da população da Organização Mundial da Saúde (OMS) como peso para ajuste.

As análises foram realizadas em estratos etários (0-4, 5-9, 10-14, 15-19, 20-29, 30-39, 40-49, 50-59, 60-69, 70-79 e ≥ 80 anos). As análises estatísticas foram realizadas usando Stata (STATA Corp LP, Texas, EUA).

Artigo 3 - "VARIATION OF RS3754689 AT LACTASE GENE AND INHIBITORS IN ADMIXED BRAZILIAN PATIENTS WITH HEMOPHILIA A"

Zuccherato LW, Roberti MRF, Jardim LL, Rezende SM. Haemophilia. 2018 Jul;24(4):e283-e285.

Para este artigo, foram incluídos indivíduos com hemofilia A grave e moderadamente grave (FVIII $\leq$ 2%), participantes de três estudos diferentes - o Estudo HEMFIL (n = 61), o Estudo BrazilIT (n = 55), uma coorte de pacientes que desenvolveram inibidor estão em tratamento com o protocolo de imunotolerância e de um estudo que incluiu pacientes da Fundação HEMOMINAS (n = 44), totalizando 160 pacientes.

A identificação do gene da Lactase foi realizada através da genotipagem para rs3754689, usando a metodologia Taqman (Id C_2104738_10; Thermo Fisher - Waltham, EUA).

O status do inibidor foi definido como positivo (Inh+) quando o nível do inibidor foi $\geq 0,6$ unidades Bethesda (BU)/mL, detectado em duas ocasiões distintas, dentro de um período de 2 a 4 semanas. Os inibidores de alto título foram considerados como > 5 BU/mL pelo menos uma em

qualquer ocasião e os de baixo título, quando ≤ 5 BU mL. Pacientes definidos como negativos para inibidor (Inh-) foram tratados por pelo menos 50 dias de exposição (DE) sem desenvolvimento de inibidores.

Para avaliar a frequência do polimorfismo na população brasileira, os resultados foram comparados com uma coorte de 5.822 de indivíduos saudáveis, da Iniciativa EPIGEN Brasil. O EPIGEN representa um amplo panorama genômico da América Latina, com cerca de 2,2 milhões de single nucleotide polymorphisms (SNPs) de três coortes brasileiras de base populacional, compreendendo diversos estudos demográficos.

Inhibitor incidence in haemophilia A under exclusive use of a third-generation recombinant factor VIII concentrate: results of the HEMFIL Cohort Study

The development of an inhibitor is the most serious complication in patients with haemophilia A (HA). Of all risk factors associated with inhibitor development, type of factor VIII (FVIII) concentrate is the most debated. Several studies have shown that recombinant (r) FVIII concentrates are associated with a higher risk for inhibitor development in comparison with plasma-derived (pd) ones (Iorio *et al*, 2010; Gouw *et al*, 2013; Calvez *et al*, 2014, 2018; Collins *et al*, 2014; Peyvandi *et al*, 2016). The SIPPET (Survey of Inhibitors in Plasma Product-Exposed Toddlers) Study was the first randomized clinical trial to compare FVIII concentrates according to their source (Peyvandi *et al*, 2016). This study

showed that the cumulative incidence was 44.5% [95% confidence interval (CI), 34.7–54.3] vs. 26.8% (95% CI, 18.3–35.2) for all inhibitors and 28.4% (95% CI, 19.6–37.2) vs. 18.6% (95% CI, 11.1–26.9) for high-titre inhibitors in users of rFVIII and pdFVIII concentrates, respectively. This resulted in 87% higher incidence of inhibitors in patients using rFVIII in comparison with pdFVIII [hazard ratio (HR), 1.87; 95% CI, 1.17–2.96] (Peyvandi *et al*, 2016).

The RODIN (Research of Determinants of Inhibitor Development) Study found that a second-generation full-length rFVIII was associated with an increased risk of inhibitor development as compared with other rFVIII products

Table I. Characteristics of patients included in the study.

	All patients (<i>n</i> = 70)	Completed follow-up (<i>n</i> = 61)	
		No inhibitor* (<i>n</i> = 37)	Inhibitor (<i>n</i> = 24)
Age at baseline, months; median (IQR)	12.6 (7.0–14.0)	10.0 (5.3–14.0)	12.0 (8.0–14.0)
Age at inhibitor development, in months; median (IQR)	NA	NA	15.5 (12.0–20.8)
Weight at baseline, kg; median (IQR)	9.3 (8.0–11.0)	9.0 (8.0–11.8)	9.5 (9.0–11.0)
Ethnicity; <i>n</i> (%)			
White	45 (64)	25 (67)	15 (62)
Black	13 (19)	5 (14)	4 (17)
Mixed	11 (16)	6 (16)	5 (21)
Indian native	1 (1)	1 (3)	0 (0)
Reason for diagnosis; <i>n</i> (%)			
Bleeding	58 (83)	30 (81)	20 (83)
Family history	12 (17)	7 (19)	4 (17)
Type of treatment; <i>n</i> (%)			
Prophylaxis†	58 (83)	37 (100)	15 (62)
On demand	12 (17)	0 (0)	9 (38)
ED at inhibitor development; median (IQR)	NA	NA	14.0 (7.5–18.5)
Inhibitor titre; <i>n</i> (%)			
Low (<5 BU/ml)	7 (10)	NA	7 (29)
High (≥5 BU/ml)	17 (24)	NA	17 (71)
More than 5 consecutive ED to FVIII‡; <i>n</i> (%)			
Yes	13 (19)	10 (27)	3 (12)
No	57 (81)	27 (73)	21 (88)
Allergy; <i>n</i> (%)	12 (17)	6 (16)	3 (12)
Family history of haemophilia; <i>n</i> (%)	35 (50)	19 (51)	12 (50)
Family history of inhibitor; <i>n</i> (%)	2 (3)	1 (3)	1 (4)

BU, bethesda units; ED, exposure days; FVIII, factor VIII; IQR, interquartile range; *n*, number of patients; NA, not applicable.

*Patients who completed 75 exposure days without inhibitor development.

†Prophylaxis was defined as ADVATE® infusions at 1–3 times a week, with the aim of preventing bleeds.

‡On at least one occasion during the treatment.

(HR, 1.60; 95% CI, 1.08–2.37) (Gouw *et al*, 2013). Subsequent retrospective studies reported similar results, 75% (HR, 1.75; 95% CI, 1.11–2.76) (Calvez *et al*, 2014) and 55% (HR, 1.55; 95% CI, 0.97–2.49) (Collins *et al*, 2014) among patients using the same brand of rFVIII. In the latter, 45 out of 128 (35.2%; 95% CI, 27.4–43.8) patients treated with a second-generation rFVIII (Kogenate Bayer/Helixate NexGen, both from Bayer HealthCare, Barmen, Germany) developed inhibitors compared with 42 out of 172 (24.4%; 95% CI, 18.6–31.4) with ADVATE® ($P = 0.04$). Recently, a French cohort study of previously untreated patients (PUPs) with severe HA (Calvez *et al*, 2018) found that the cumulative incidence of high-titre inhibitors at 75 exposure days (ED) was 12.7% (95% CI, 7.7–20.6) with a pdFVIII (Factane®; LFB, Paris, France), 20.4% (95% CI, 14.0–29.1) and 31.6% (95% CI, 23.5–41.7) with two rFVIII, ADVATE® (Shire, Lexington, USA) and Kogenate®FS (Bayer HealthCare), respectively (Calvez *et al*, 2018). These findings suggest that the immunogenicity may not be the same for different rFVIII concentrates. In the literature, estimates of immunogenicity per product have limited precision, due to the relatively low number of patients treated with each source. In order to

improve future precision regarding the estimated immunogenicity of the rFVIII product used in Brazil, this study aimed to evaluate the incidence of inhibitors in a cohort of Brazilian PUPs with HA under the exclusive use of a third-generation rFVIII concentrate (ADVATE®) in the HEMFIL Study.

HEMFIL is an ongoing, prospective cohort study. Patients were enrolled consecutively at the time of diagnosis in five Brazilian haemophilia treatment centres (HTC) from 2013 to 2018, and were followed for up to 75 ED. After enrolment, patients were clinically evaluated (clinical and laboratory data) and completed standardized forms for collection of socio-demographic data (Table I). FVIII activity (FVIII:C) was measured at diagnosis and inhibitor measurements were performed every 5–10 ED. The primary outcome was the development of inhibitor, defined as a positive antibody titre above 0.6 Bethesda Units (BU)/ml in two consecutive measurements 2–4 weeks apart (White *et al*, 2001). The secondary outcome was the development of high titre inhibitor (≥ 5 BU/ml). Time to inhibitor development was calculated by Kaplan-Meier cumulative incidence with cumulative ED as the time variable. All parents/guardians signed a written

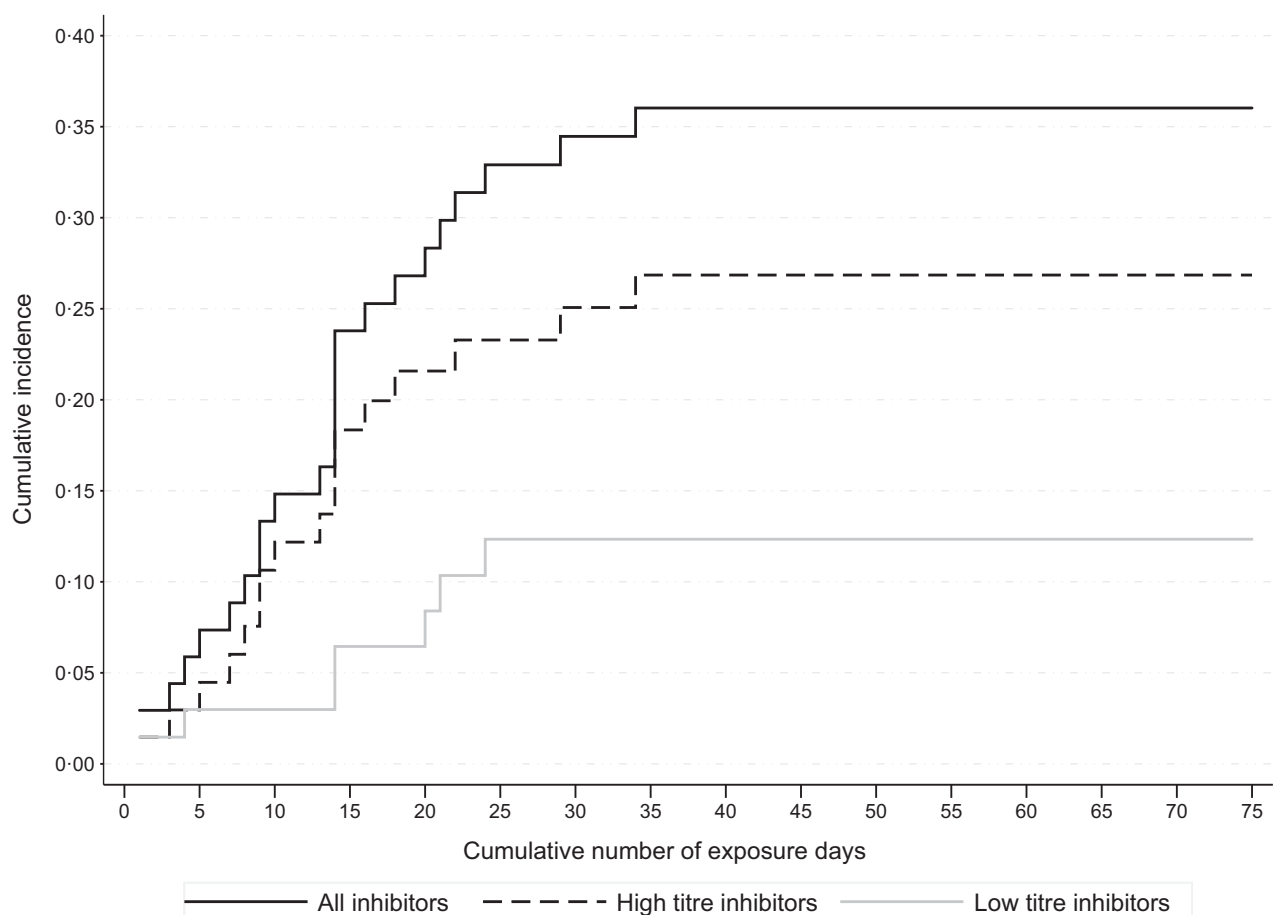


Fig 1. Cumulative incidence of inhibitor development according to cumulative number of factor VIII exposure days for all inhibitors, high titre and low titre inhibitors.

informed consent. The study was approved by institutional ethical committees.

A total of 70 PUPs with severe HA (baseline FVIII: C < 1%) were included, 61 (85%) of whom completed the follow-up. Inhibitor was detected in 24/63 patients of which 17 were high-titre. Among patients who developed inhibitors, 17 (68%) were subsequently treated with immune tolerance.

A total of 37/61 patients reached 75 ED without developing an inhibitor. There are 9 patients under follow-up, 6 (67%) of whom reached at least 30 ED. Inhibitor development occurred before 20 ED in 19/24 (79%) PUPs. The median time for inhibitor development was 14 ED (95% CI, 7.5–18) with a median age of 15.0 months [interquartile range (IQR), 12.0–19.5]. Indeed, this corroborates the study by Calvez *et al* (2018) who detected inhibitor at a median of 14 ED (IQR, 8.0–20.0) and a median age of 16.0 months (IQR, 12.0–24.0).

In our study, the cumulative incidence at 75 ED was 36% (95% CI, 25.7–48.7%) for all inhibitors, 27% (95% CI, 17.5–39.6%) for high-titre inhibitors and 13% (95% CI, 6.0–24.3%) for low-titre inhibitors (Fig 1). Our results are similar to the results of the SIPPET Study, which found a 28.4% cumulative incidence of high-titre inhibitors with rFVIII concentrates (Peyvandi *et al*, 2016). However, in the SIPPET study, only 13 of 126 (10.3%) patients were treated with ADVATE®.

The main strength of our study is related to its methodological design as a cohort study of PUPs under exclusive use of a third generation rFVIII who were consecutively enrolled at diagnosis and followed-up prospectively with inhibitor development as outcome. Indeed, except for SIPPET (Peyvandi *et al*, 2016), all previous studies evaluating inhibitor incidences have been performed in Caucasian populations whereas the Brazilian population is widely mixed. Studying inhibitor incidence in different populations is important because it probably varies according to ethnicity (Gunasekera *et al*, 2015). The results of our study suggest that immunogenicity of ADVATE® does not seem to be influenced by different ethnic background. Unfortunately, we were unable to compare inhibitor development with pdFVIII or other brands of rFVIII concentrates, as currently, in Brazil, ADVATE® is the only type of rFVIII concentrate purchased by the Ministry of Health and, therefore, available for treatment of HA. Another limitation worth mentioning is that the measurement of inhibitors was not performed in a central laboratory. However, it was performed according to national recommendation in all participating HTC.

In conclusion, the cumulative incidence of inhibitors with the exclusive use of ADVATE® in PUPs with severe HA was 36% for all inhibitors and 27% for high-titre inhibitors.

References

Calvez, T., Chambost, H., Claeysens-Donadel, S., d'Oiron, R., Goulet, V., Guillet, B., Héritier, V., Milien, V., Rothschild, C., Roussel-Robert, V., Vinciguerra, C. & Goudemand, J.; FranceCoag

Network. (2014) Recombinant factor VIII products and inhibitor development in previously untreated boys with severe hemophilia A. *Blood*, **124**, 3398–3408.

Calvez, T., Chambost, H., d'Oiron, R., Dalibard, V., Demiguel, V., Doncarli, A., Gruel, Y.,

Huguenin, Y., Lutz, P., Rothschild, C., Vinciguerra, C. & Goudemand, J.; for FranceCoag Collaborators. (2018) Analyses of the FranceCoag cohort support differences in immunogenicity among one plasma-derived and two recombinant factor VIII brands in boys with

Acknowledgements

The authors thank Camila Caram Deelder for the support with the analyses. This study was funded by FAPEMIG, CAPES and CNPq. LLJ received fellowship from CAPES.

Author contributions

L. L. Jardim performed the research, analyzed the data and wrote the paper; J. van Der Bom contributed with study design and data analysis; C. C. Brommonschenkel collected clinical data; S. C. Gouw contributed with data analysis; S. M. Rezende designed the research, contributed to data analysis and wrote the paper. All authors revised and approved the final version of the manuscript.

Leticia L. Jardim^{1,2} 

Johanna van der Bom²

Christina C. Brommonschenkel¹

Samantha C. Gouw²

Suely M. Rezende¹ 

on the behalf of the HEMFIL Study Group*

¹Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais,

Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil and ²Department of

Clinical Epidemiology, Leiden University Medical Centre, Leiden, the Netherlands.

E-mail: suely.rezende@uol.com.br

*The HEMFIL Study Group are listed in Appendix.

Keywords: haemophilia, inhibitor, ADVATE®, incidence

Appendix:

The HEMFIL Study group

Daniel G. Chaves³, Marcio P. Santana³, Mônica H. Cerqueira⁴, Alessandra Prezotti⁵, Claudia Lorenzato⁶, Vivian K. Franco⁷

³Hemocentro de Belo Horizonte, Fundação HEMOMI-NAS, Belo Horizonte, Brazil.

⁴Instituto de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (HEMORIO), Rio de Janeiro, Brazil.

⁵Centro de Hematologia e Hemoterapia do Espírito Santo (HEMOES), Vitoria, Brazil.

⁶Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMOPAR), Curitiba, Brazil.

⁷Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC), Florianópolis, Brazil.

- severe hemophilia A. *Haematologica*, **103**, 179–189.
- Collins, P., Palmer, B., Chalmers, E., Hart, D.P., Liesner, R., Rangarajan, S., Talks, K., Williams, M. & Hay, C.R.; UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. (2014) Factor VIII brand and the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated UK children with severe hemophilia A, 2000–2011. *Blood*, **124**, 3389–3397.
- Gouw, S.C., van der Bom, J.G., Ljung, R., Escuriola, C., Cid, A.R., Claeysens-Donadel, S., van Geet, C., Kenet, G., Mäkipernaa, A., Molinari, A.C., Muntean, W., Kobelt, R., Rivard, G., Santagostino, E., Thomas, A. & van den Berg, H.M.; PedNet and RODIN Study Group. (2013) Factor VIII products and inhibitor development in severe hemophilia A. *New England Journal of Medicine*, **368**, 231–239.
- Gunasekera, D., Ettinger, R.A., Nakaya Fletcher, S., James, E.A., Liu, M., Barrett, J.C., Withycombe, J., Matthews, D.C., Epstein, M.S., Hughes, R.J. & Pratt, K.P.; Personalized Approaches to Therapies for Hemophilia (PATH) Study Investigators. (2015) Factor VIII gene variants and inhibitor risk in African American hemophilia A patients. *Blood*, **126**, 895–904.
- Iorio, A., Halimeh, S., Holzhauser, S., Goldenberg, N., Marchesini, E., Marcucci, M., Young, G., Bidlingmaier, C., Brandao, L.R., Ettingshausen, C.E., Gringeri, A., Kenet, G., Knöfler, R., Kreuz, W., Kurnik, K., Manner, D., Santagostino, E., Mannucci, P.M. & Nowak-Göttl, U. (2010) Rate of inhibitor development in previously untreated hemophilia A patients treated with plasma-derived or recombinant factor VIII concentrates: a systematic review. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **8**, 1256–1265.
- Peyvandi, F., Mannucci, P.M., Garagiola, I., El-Beshlawy, A., Elalfy, M., Ramanan, V., Eshghi, P., Hanagavadi, S., Varadarajan, R., Karimi, M., Manghani, M.V., Ross, C., Young, G., Seth, T., Apte, S., Nayak, D.M., Santagostino, E., Mancuso, M.E., Sandoval Gonzalez, A.C., Mahlangu, J.N., Bonanad Boix, S., Cerqueira, M., Ewing, N.P., Male, C., Owaidah, T., Soto Arellano, V., Kobrinsky, N.L., Majumdar, S., Perez Garrido, R., Sachdeva, A., Simpson, M., Thomas, M., Zanon, E., Antmen, B., Kavakli, K., Manco-Johnson, M.J., Martinez, M., Marzouka, E., Mazzucconi, M.G., Neme, D., Palomo Bravo, A., Paredes Aguilera, R., Prezotti, A., Schmitt, K., Wicklund, B.M., Zulfikar, B. & Rosendaal, F.R. (2016) A randomized trial of factor VIII and neutralizing antibodies in hemophilia A. *New England Journal of Medicine*, **374**, 2054–2064.
- White, G.C., Rosendaal, F., Aledort, L.M., Lusher, J.M., Rothschild, C. & Ingerslev, J.; on behalf of the Factor VIII and Factor IX Subcommittee (2001) Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thrombosis and Haemostasis*, **85**, 560.

ORIGINAL ARTICLE

Mortality of patients with haemophilia in Brazil: First report

Leticia Lemos Jardim^{1,2}  | Johanna G. van der Bom^{2,3} | Camila Caram-Deelder^{2,3} |
Samantha Claudia Gouw³ | Mariangela Leal Cherchiglia¹ | Suely Meireles Rezende¹ 

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

²Department of Clinical Epidemiology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

³Center for Clinical Transfusion Research, Sanquin, Leiden, The Netherlands

Correspondence

Suely Meireles Rezende, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.
Emails: suely.rezende@uol.com.br; srezende@medicina.ufmg.br

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Introduction: Brazil has the fourth largest world population of patients with haemophilia. However, mortality rates in this population are unknown.

Aim: To analyse mortality and its causes in Brazilian patients with haemophilia from 2000 to 2014.

Methods: The number of deceased patients with haemophilia and causes of death were obtained from the Brazilian National Mortality Information System (SIM), according to the 10th International Classification of Diseases (ICD-10). Standardized mortality ratios (SMR) were calculated to estimate the rate of overall death of patients with haemophilia relative to that of the Brazilian general male population.

Results: A total of 784 deaths were identified in the period of 15 years. Mortality of patients with haemophilia was 13% higher when compared with the general male population (SMR 1.13, 95% CI: 1.01-1.16). Haemorrhage was the main cause of death ($n = 254$; 32.4%) of which 137 (54%) was intracranial haemorrhage. The total number of deaths due to HIV decreased over the years, and an increase in deaths due to cancer and cardiovascular disease was observed. A total of 129 deaths (16.5%) were related to hepatitis infection, of whom, 109 (86.5%) patients also presented with cirrhosis and hepatocellular carcinoma or other liver diseases.

Conclusion: Mortality rate of Brazilian patients with haemophilia decreased over the evaluated period. Intracranial haemorrhage is still an important cause of death in these patients, which requires major effort for prevention. Death due to age-related cardiovascular disease and cancer has increased over the years, following the same tendency observed in developed countries.

KEYWORDS

Brazil, epidemiology, factor VIII, haemophilia, mortality, standardized mortality ratios

1 | INTRODUCTION

Haemophilia is an inherited X-linked bleeding disorder, characterized by the deficiency of factor VIII (haemophilia A) or factor IX (haemophilia B). Haemophilia A and haemophilia B affect respectively 1:5000-10 000 and 1:35 000-50 000 newborn males worldwide.^{1,2} The treatment of haemophilia is based on the episodic and/or prophylactic replacement of clotting factor concentrates.³

Despite the technological progress, mortality of patients with haemophilia is still higher than that of the general male population in different countries as United States, The Netherlands and United Kingdom.^{4,5} However, studies investigating the mortality of haemophilia patients in developing countries are scarce.^{6,7} To our concern, mortality in patients with haemophilia in Latin America has not been published.

Brazil has the fourth largest world population of haemophilia patients, after United States, India and China, accounting for 12 119

individuals registered in 2016,⁸ of whom 10 123 and 1996 patients are registered as having haemophilia A and haemophilia B, respectively. Haemophilia care in Brazil is guaranteed by the National Public Health System (*Sistema Único de Saúde*). In 2009, the Brazilian Ministry of Health initiated a web-based registry of patients with inherited bleeding disorders, including haemophilia.⁹ From 2011 onwards, haemophilia care improved as a result of the implementation of health policies involving increased purchase of factor concentrates leading to the implementation of immune tolerance induction (ITI), prophylaxis and home treatment. Since mortality studies can be useful as a tool to monitor progress of care in a population, it can be of value for policymakers and stakeholders to evaluate health policies.

The aim of the study was to investigate the mortality of patients with haemophilia in Brazil and to evaluate the causes of death from 2000 to 2014.

2 | METHODS

2.1 | Data source

This retrospective study was performed using the Brazilian National Mortality Information System (*Sistema de Informação sobre Mortalidade*—SIM) as data source. The SIM system is based on the notifications provided by the death certificate registration. The death certificate is unique for the entire country since 1975 and is mandatory for registration of death and for burial purposes.

The death certificate is composed of two parts for primary cause of death and comorbidities. Part I has four lines, the first is for the ICD-10 code of the primary cause of death, characterized as the disease or injury that initiates the sequence of morbid states, or the circumstances of the accident or violence, which led directly to death. The other three lines are filled in with the complications of the underlying cause, such as intermediate clinical states that eventually reach the terminal or immediate cause. Part II is filled in with the contributing causes, which are comorbidities without a direct relation to the primary cause of death.

We had access to the mortality information of the entire Brazilian male population, primary and secondary causes of death, at patient level, from 2000 to 2014.

Data on the general male population alive in Brazil at the same period were provided by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE). The IBGE is a public institute responsible for providing information about the country population, economy and geosciences. The decennial national census provides the official population count all over the national territory. The data are also available by assessing the website <http://ibge.gov.br>. This information is grouped by age and geographical region (north, northeast, southeast, south and midwest).

2.2 | Outcome definitions

Deaths and causes of death of male patients with congenital haemophilia A and haemophilia B were identified according to the 10th International Classification of Diseases (ICD-10). Deceased

individuals with haemophilia were selected from SIM when at least one of the fields in the death certificate reported ICD10-code "D66," for haemophilia A (hereditary factor VIII deficiency), or "D67," for haemophilia B (hereditary factor IX deficiency). Haemophilia A and haemophilia B were analysed as one group.

In order to evaluate comorbidities of deceased patients with haemophilia, we surveyed all ICD-10 codes mentioned in any of the fields of death certificate. The most frequent codes were related to HIV, hepatitis, cancer, kidney diseases, haemorrhage and cardiovascular diseases such as diabetes, hypertension, angina, myocardial infarction and thrombosis. Then, a survey of all the codes related to these complications was performed followed by a new search on the SIM database. Among patients with hepatitis, we also looked for codes of liver diseases including cirrhosis, liver failure, fibrosis and liver cancer. Among patients with haemorrhage, codes for intracranial haemorrhage were specifically researched.

The following codes were researched in the fields of the death certificate: B20, B21, B22, B23, B24 and R75 for HIV; B16, B17 and B18 for hepatitis B and hepatitis C; K72, K73, K74, K75, K76, C22, C23 and C24 for liver disease; N17, N18, N19, N99.0 and P96.0 for kidney disease; R04, R58, D62, K92.0, K92.2, H11.3, H35.6, H43.1, H45.0, K25, K26, K27 and K28 for haemorrhage; I60, I61, I62, P10, P52 and S06 intracranial haemorrhage; E10, E11, E12, E13, E14, I10, I11, I12, I13, I15, I20, I21, I22, I23, I24, I25, I26, I27, I31, I32, I33, I46, I49, I50, I63, I64, I65, I66, I67 for cardiovascular disease; C00 until to D48, Z85 and Z86 for cancer.

Patients with acquired haemophilia or other coagulation defects were not included in the analysis. Therefore, the code D68.4, "Acquired coagulation factor deficiency," as well as all other codes derived from CID D68, ie, "Other coagulation defects," were not analysed.

2.3 | Statistical analysis

The standardized mortality ratio (SMR) refers the number of observed deaths divided by the number that was expected if the mortality rate in the study group and its specific age distribution was the same as that in the general population. Thus, an estimation of the number of patients with haemophilia who were alive between 2000 and 2014 was needed to calculate the expected number of deaths. In the period from 2009 to 2014, the exact number of patients with haemophilia is available from annual publications by the Ministry of Health through the "Profile of inherited bleeding disorders in Brazil".¹⁰⁻¹² For the period 2000-2009, the number of patients with haemophilia in Brazil is unknown and had to be estimated. We estimated the numbers of patients with haemophilia for each year from 2000 to 2014, by multiplying the mean prevalence of haemophilia of the period 2009-2014, per age category with the general male population of each corresponding age group.

To compare the overall mortality rate in the haemophilia population with the Brazilian male population, the SMRs were calculated for the total period 2000-2014. To evaluate time trends in mortality rates in the haemophilia population, age-adjusted mortality rates

were calculated per three-year periods: (a) from 2000 to 2002; (b) from 2003 to 2005; (c) from 2006 to 2008; (d) from 2009 to 2011; and (e) 2012 to 2014, using the World Health Organization (WHO) population age distribution as weights¹³

The analyses were performed in strata of age (0-4, 5-9, 10-14, 15-19, 20-29, 30-39, 40-49, 50-59, 60-69, 70-79 and > 80 years old) and 3-year period. Statistical analyses were performed using Stata (STATA Corp LP, Texas, USA).

3 | RESULTS

3.1 | Mortality rates of patients with haemophilia in Brazil

From January 2000 to December 2014, 784 deaths of patients with haemophilia were identified. The overall mortality of patients with haemophilia was 13% higher when compared with the general male population (SMR, 1.13; 95% CI: 1.01-1.16). SMR was 1.51 (95% CI: 1.29-1.74) in 2000-2002 and 0.89 (95% CI: 0.74-1.04) in 2012-2014 (Table 1).

There was a major variation of SMR between years 2000 and 2008 and a tendency to a plateau which ranged between 0.83 and 0.94 from 2009 to 2014 (Figure 1).

3.2 | Causes of death and other related disease

Table 2 presents the causes of death categorized according to the time periods. Haemorrhage was the most frequent cause of death, reported in 254/784 (32.4%) patients with haemophilia, and in most patients ($n = 137$; 54%), it was due to intracranial haemorrhage.

HIV as a cause of death in patients with haemophilia decreased from 30.8% of all deaths in 2000-2002 to 11.3% in 2012-2014. The opposite was observed on cancer and cardiovascular disease, which increased from 7.7% to 12.1% and 13.7% to 25.5%, respectively, from 2000-2002 to 2012-2014. A total of 129 patients died due to hepatitis infection, of whom 109 (86.5%) also presented liver diseases (Table 2).

The frequency of HCV and HBV infection in male patients who died with haemophilia A and haemophilia B was the highest in the age group 40-49 years in all the periods analysed (Table 3). As expected,

there was no death related to hepatitis B or C infection in patients with haemophilia in the age range of 0-14 years and only one death in the age group 15-19 years in all the periods analysed (Table 3).

Death due to haemorrhage was the most common cause of mortality, especially in adult patients with haemophilia. The highest frequency was observed in the age range of 40-49 years in all periods evaluated. Although numbers are small, there was a trend towards a reduction of deaths due to haemorrhage in the age group 0-4 years from year 2000 to year 2014 (Table 4).

In 137 patients who died of intracranial haemorrhage, 33.6% and 12.4% were patients of the age groups 40-59 and 0-4 years, respectively. It was observed a decrease in the number of deaths due to intracranial haemorrhage in the age groups 0-4 and 5-9 years from year 2000 to year 2014, despite small numbers (Table 5).

4 | DISCUSSION

We have studied, for the first time, mortality and its related causes in Brazilian patients with haemophilia, which is the fourth world largest population affected by the disease. We found that mortality relative to that of the general Brazilian population decreased from 2000 to 2014, with no difference in mortality of haemophilia patients and the general population in 2014 (SMR, 0.89; 95% CI: 0.74-1.04). Haemorrhage remained the main cause of death, mostly due to intracranial bleeding.

In the past 30 years, haemophilia care has improved significantly worldwide. This is reflected by nearly normal life expectancies of patients with haemophilia reported in developed countries,¹⁴ especially when patients infected with HIV are excluded from analysis.^{4,15} However, studies in low- and middle-income countries are scarce,^{6,7} and therefore, mortality and its causes are virtually unknown in these populations.

In 2006, the mortality of patients with haemophilia in the Netherlands (1992-2001) was 2.3 higher in comparison with the general male population (SMR 2.3; 95% CI: 1.9-2.8).⁴ When patients with HIV were excluded, the analysis showed a lower SMR of 1.7 (95% CI: 1.3-2.7). In the present study, the mortality in haemophilia patients evaluated between 2000 and 2014 was 13% higher when compared with the general male population in Brazil (SMR, 1.13; 95% CI: 1.01-1.16).

Our findings show a progressive decrease in the SMRs throughout the years 2000-2014. These findings likely reflect the improvement in haemophilia care, which took place in Brazil in the last 10 years. In 2007, the Ministry of Health implemented a short-home treatment programme, which comprised delivering three doses of factor concentrate for home treatment to be used for immediate replacement in case of bleeding. In 2009, a web-based, national registry on inherited bleeding disorders was created.⁹ In 2012, prophylaxis, full home treatment and ITI programmes were implemented. Although this study was not designed to investigate this impact, it is likely that these treatment strategies influenced mortality of patients with haemophilia in Brazil.

TABLE 1 Standardized mortality ratios for males with haemophilia A and B

Period	Observed deaths, n	SMRs	95% CI
2000-2002	182	1.51	[1.29, 1.74]
2003-2005	166	1.32	[1.12, 1.53]
2006-2008	166	1.19	[1.01, 1.38]
2009-2011	129	0.86	[0.71, 1.02]
2012-2014	141	0.89	[0.74, 1.04]
2000-2014	784	1.13	[1.01, 1.16]

95% CI, 95% confidence interval; N, number; SMRs, standardized mortality ratios.

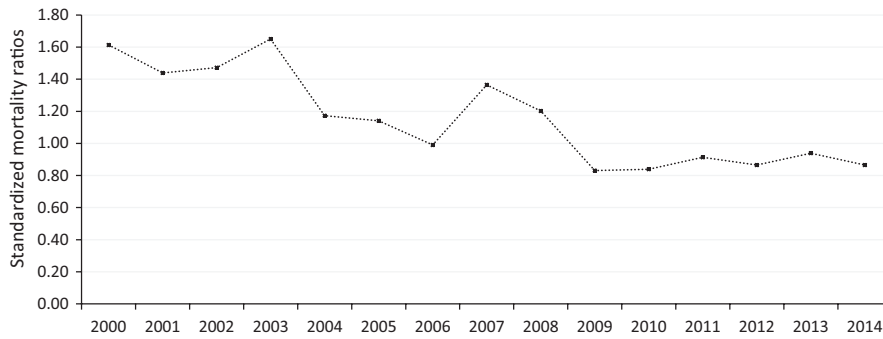


FIGURE 1 Standardized mortality ratios (SMRs) for males with haemophilia A and haemophilia B by year

TABLE 2 Causes of death and other conditions in male patients with haemophilia A and B according to the ICD-10 classification^a

	2000-2002 (n = 182)	2003-2005 (n = 166)	2006-2008 (n = 166)	2009-2011 (n = 129)	2012-2014 (n = 141)
Haemorrhage, n (%)	56 (30.8)	52 (31.3)	54 (32.5)	45 (34.9)	47 (33.3)
Intracranial haemorrhage, n (%)	29/56 (51.8)	28/52 (53.8)	28/54 (51.9)	21/45 (46.7)	31/47 (66.0)
HIV, n (%)	56 (30.8)	38 (22.9)	29 (17.5)	17 (13.2)	16 (11.3)
Cardiovascular disease, n (%)	25 (13.7)	33 (19.9)	29 (17.5)	29 (22.5)	36 (25.5)
HCV and HBV, n (%)	25 (13.7)	27 (16.3)	28 (16.9)	17 (13.2)	32 (22.7)
Liver disease, n (%)	24/25 (96)	23/27 (85.2)	23/28 (82.1)	14/17 (82.4)	25/32 (78.1)
Kidney disease, n (%)	9 (4.9)	12 (7.22)	19 (11.6)	15 (11.6)	9 (6.4)
Cancer, n (%)	14 (7.7)	12 (7.22)	9 (5.4)	3 (2.3)	17 (12.1)
Other, n (%)	24 (13.3)	22 (13.3)	22 (13.3)	16 (12.4)	16 (11.3)

n, number of patients.

^aSome patients presented more than one related cause of death.

TABLE 3 Number of male patients (%) with HCV and HBV infection who died with haemophilia A and B by age groups and 3-year period

Age group, in years	2000-2002	2003-2005	2006-2008	2009-2011	2012-2014	Total
0-4, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
5-9, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
10-14, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
15-19, n (%)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.8)
20-29, n (%)	1 (4)	5 (18.5)	3 (10.7)	2 (11.8)	2 (6.3)	13 (10)
30-39, n (%)	6 (24)	7 (25.9)	5 (18.9)	4 (23.5)	3 (9.4)	25 (19.4)
40-49, n (%)	14 (56)	9 (33.3)	12 (42.9)	4 (23.5)	8 (25)	47 (36.4)
50-59, n (%)	3 (12)	3 (11.1)	5 (18.9)	3 (17.6)	5 (15.6)	19 (14.7)
60-69, n (%)	0 (0)	3 (11.1)	2 (7.2)	3 (17.6)	9 (28.1)	17 (13.2)
70-79, n (%)	0 (0)	0 (0)	1 (3.6)	1 (5.9)	5 (15.6)	7 (5.4)
>80, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total, n	25	27	28	17	32	129

n, number of patients.

Despite the advances in haemophilia care, others have shown that after infectious diseases-related effects, bleeding complications are still the main cause of death and the associated with reduction in life expectancy of patients with haemophilia.^{5,6,16,17} Our results confirm that in Brazil, haemorrhage is also an important cause of death (32.3%), with highest occurrence among patients between 40

and 49 years of age. Moreover, intracranial haemorrhage remained an important cause of death throughout the years, not showing reduction even after 2009. This finding corroborates a recent retrospective multicentre cohort study from United States, which found that the rate of intracranial haemorrhage remained constant from 2002 to 2011.¹⁸ When we evaluated the percentage of death due

TABLE 4 Number of male patients (%) with haemorrhage who died with haemophilia A and B by age groups and 3-year period

Age group, in years	2000-2002	2003-2005	2006-2008	2009-2011	2012-2014	Total
0-4, n (%)	6 (10.7)	7 (13.5)	5 (9.3)	3 (6.7)	1 (2.1)	22 (8.7)
5-9, n (%)	4 (7.1)	4 (7.7)	2 (3.7)	2 (4.4)	2 (4.3)	14 (5.5)
10-14, n (%)	1 (1.8)	2 (3.8)	2 (3.7)	0 (0)	0 (0)	5 (2)
15-19, n (%)	3 (1.8)	5 (9.6)	6 (11.1)	1 (2.2)	4 (8.5)	19 (7.5)
20-29, n (%)	8 (14.3)	6 (11.5)	6 (11.1)	4 (8.9)	6 (12.8)	30 (11.8)
30-39, n (%)	7 (12.5)	4 (7.7)	6 (11.1)	9 (20)	5 (10.6)	31 (12.2)
40-49, n (%)	15 (26.8)	11 (21.2)	12 (22.2)	9 (20)	9 (19.1)	56 (22)
50-59, n (%)	5 (8.9)	6 (11.5)	8 (14.8)	5 (11.1)	9 (19.1)	33 (13)
60-69, n (%)	6 (10.7)	4 (7.7)	5 (9.3)	8 (17.8)	7 (14.9)	30 (11.8)
70-79, n (%)	1 (1.8)	2 (3.8)	1 (1.9)	4 (8.9)	3 (6.4)	11 (4.3)
>80, n (%)	0 (0)	1 (1.9)	1 (1.9)	0 (0)	1 (2.1)	3 (1.2)
Total, n	56	52	54	45	47	254

n, number of patients.

to intracranial haemorrhage according to age range, we found that it decreased in the very young patients (age range, 0-4 years), from 17.2% (2000-2002) to 3.2% (2012-2014). It is tempting to suggest that this might result from the implementation of early primary prophylaxis for severe haemophilia on this age group. Andersson et al recently reported that children on regular, frequent prophylaxis have a lower risk of intracranial haemorrhage compared with those using non-frequent or no prophylaxis.¹⁹ However, since the present study was not designed to investigate the impact of health policies on the outcome measurements, further studies will be needed to confirm this.

We found an important reduction in mortality due to HIV infection from 30.8% (2000-2002) to 11.3% (2012-2014). In the 1980s and 1990s, mortality in patients with haemophilia was strongly influenced by infectious diseases, mainly HIV and hepatitis infection.^{4,17} In the following years, due to better treatment and preventive

strategies, the number deaths resulting from HIV infection has gradually decreased to almost zero.^{17,20,21} In our study, although there has been a slight increase in the rate of death due to hepatitis throughout the years, most cases (56%) occurred in the first period (2000-2002) evaluated and in patients in the age range of 40-49 years. As expected, there was no death due to hepatitis B or C in the age groups 0-14 years. However, at the calendar period 2012-2014, the age group 60-69 years showed the highest frequency (28.1%). This data suggests that patients with haemophilia and hepatitis are probably living longer despite their infectious status. This improvement likely reflects the universal access that the Brazilian patients with haemophilia have to vaccination for hepatitis A and hepatitis B and also to the antiviral therapy for hepatitis C since 1993. Despite all improvements, chronic liver diseases, mainly resulting from hepatitis C infection, are still an important cause of mortality in patients with haemophilia.^{5,16,22} In our study, liver disease in patients with

TABLE 5 Number of male patients (%) with intracranial haemorrhage who died with haemophilia A and B by age groups and 3-year period

Age group, in years	2000-2002	2003-2005	2006-2008	2009-2011	2012-2014	Total
0-4, n (%)	5 (17.2)	6 (21.4)	4 (14.3)	1 (4.8)	1 (3.2)	17 (12.4)
5-9, n (%)	3 (10.3)	4 (14.3)	2 (7.1)	1 (4.8)	2 (6.5)	12 (8.8)
10-14, n (%)	0 (0)	1 (3.6)	2 (7.1)	0 (0)	0 (0)	3 (2.2)
15-19, n (%)	1 (3.4)	2 (7.1)	5 (17.9)	0 (0)	4 (12.9)	12 (8.8)
20-29, n (%)	6 (20.7)	2 (7.1)	3 (10.7)	1 (4.8)	3 (9.7)	15 (10.9)
30-39, n (%)	0 (0)	1 (3.6)	1 (3.6)	2 (9.5)	3 (9.7)	7 (5.1)
40-49, n (%)	7 (24.1)	5 (17.9)	1 (3.6)	5 (23.8)	5 (16.1)	23 (16.8)
50-59, n (%)	3 (10.3)	3 (10.7)	6 (21.4)	3 (14.3)	8 (26.4)	23 (16.8)
60-69, n (%)	4 (13.8)	2 (7.1)	2 (7.1)	4 (19)	3 (9.7)	15 (10.9)
70-79, n (%)	0 (0)	2 (7.1)	1 (3.6)	4 (19)	1 (3.2)	8 (5.8)
>80, n (%)	0 (0)	0 (0)	1 (3.6)	0 (0)	1 (3.2)	2 (1.5)
Total, n	29	28	28	21	31	137

n, number of patients.

hepatitis decreased from 2000-2002 to 2003-2005, but remained constant thereafter.

With the improvement in the life expectancy of patients with haemophilia over the years, comorbidities typically related to the normally ageing population, such as cardiovascular diseases and cancer, have risen in this population.^{16,23} However, despite the increase in mortality from cardiovascular diseases from the 2000s, these rates remain clearly lower in patients with haemophilia when compared with that expected in the general male population. This has led some authors to hypothesize that haemophilia can be protective of cardiovascular disease.^{5,16,24} In our study, mortality due to cardiovascular disease increased from 13.7% to 25.5%, respectively, from 2000-2002 to 2012-2014.

This study has some limitations. First, the prevalence of haemophilia from 2000 to 2014 was estimated. However, the estimated prevalence of the years 2010, 2012 and 2014 and the prevalence published by the Brazilian Ministry of Health¹⁰⁻¹² were very similar. Second, this study was dependent on death certificates, which are liable to incorrect filling, especially regarding the cause of death and the correct codes in the respective lines. Some of the doctors might not be skilled to complete the death certificate appropriately. Thus, we could not rule out unreported deaths and misclassification of haemophilia and causes of death. Furthermore, it was not always possible to ascertain which ICD-10 was related to the basic cause of death and which related to comorbidities. However, as described by Lima and Queiroz,²⁵ the registration of deaths in Brazil had an increment of approximately 80% of all deaths in 1980-1991 to over 95% in 2000-2010, the latter being the period evaluated in our study. Furthermore, to avoid misclassification in the death certificate, we decided to perform the analyses of haemophilia A and haemophilia B as one group, since the clinical characteristics of both diseases are similar. Third, it was not possible to further investigate other determinants of mortality as we had no access to clinical data of the patients, such as severity, type of treatment, inhibitor development and others.

In conclusion, we studied, for the first time, mortality data of the fourth largest world population of patients with haemophilia and found that mortality of patients with haemophilia decreased over the years. Death due to HIV infection showed an important reduction, and death due to cardiovascular disease and cancer have increased over the years, following the same tendency observed in the developed countries. Haemorrhage and intracranial haemorrhage are the main causes of death, requiring further attention and major efforts for prevention.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Sonia Maria Mendes Braga for the support with the analyses. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001, FAPEMIG and CNPq. LLJ received fellowship from CAPES.

DISCLOSURE

JVDB has been a teacher of educational activities of Bayer. The other authors state that they have no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTION

LLJ performed the research, analysed the data and wrote the paper; JVDB, SCG, CCD and MLC contributed with study design and data analysis; SMR designed the research, contributed to data analysis and wrote the paper. All authors revised and approved the final version of the manuscript. The authors stated that they had no interests which might be perceived as posing a conflict or bias.

ORCID

Leticia Lemos Jardim  <https://orcid.org/0000-0003-3358-0075>

Suely Meireles Rezende  <https://orcid.org/0000-0002-3083-7093>

REFERENCES

1. Rosendaal FR, Briet E. The increasing prevalence of haemophilia. *Thromb Haemost.* 1990;63:145.
2. Bolton-Maggs PH, Pasi KJ. Haemophilias A and B. *Lancet.* 2003;361:1801-1809.
3. Gilles JG, Arnout J, Vermynen J, et al. Anti-factor VIII antibodies of hemophilic patients are frequently directed towards nonfunctional determinants and do not exhibit isotypic restriction. *Blood.* 1993;82:2452-2461.
4. Plug I, Van Der Bom JG, Peters M, et al. Mortality and causes of death in patients with hemophilia, 1992-2001: a prospective cohort study. *J Thromb Haemost.* 2006;4:510-516.
5. Darby SC, Kan SW, Spooner RJ, et al. Mortality rates, life expectancy, and causes of death in people with hemophilia A or B in the United Kingdom who were not infected with HIV. *Blood.* 2007;110:815-825.
6. Chang CY, Yeh GC, Lin SY, et al. Trends in the epidemiology, diagnosed age and mortality rate of haemophiliacs in Taiwan: a population-based study, 1997-2009. *Haemophilia.* 2014;20(4):535-540.
7. Mansouritorghabeh H, Rahimi H, Mohades ST, et al. Causes of death among 379 patients with hemophilia: a developing country's report. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2018;24(4):612-617.
8. Annual Global Survey 2016. *World federation of haemophilia.* Montréal, Canada: Annual Global Survey 2016;2017:80. <https://www1.wfh.org/publication/files/pdf-1690.pdf.rfv>
9. Rezende SM, Rodrigues S, Brito K, et al. Evaluation of a web-based registry of inherited bleeding disorders: a descriptive study of the Brazilian experience with HEMOVIDAweb Coagulopatias. *Orphanet J Rare Dis.* 2017;12:27.
10. Ministério da Saúde. *Perfil das Coagulopatias Hereditárias no Brasil 2009-2010.* Brasília, Brasil: Ministério da Saúde, 2010, 69 pp.
11. Ministério da Saúde. *Perfil de coagulopatias hereditárias no Brasil 2011-2012.* Brasília, Brasil: Ministério da Saúde, 2012, 74 pp.
12. Ministério da Saúde. *Perfil de coagulopatias hereditárias no Brasil 2013-2014.* Brasília, Brasil: Ministério da Saúde Brasília, 2014, 65 pp.
13. Ahmad OB, Boschi-Pinto C, Lopez AD, et al. *Age Standardization of Rates: A New WHO Standard.* Geneva: World Health Organization;2001. GPE Discussion Paper Series: No. 31.

14. Soucie JM, Nuss R, Evatt B, et al. Mortality among males with hemophilia: relations with source of medical care. The Hemophilia Surveillance System Project Investigators. *Blood*. 2000;96:437-442.
15. Walker IR, Julian JA. Causes of death in Canadians with haemophilia 1980-1995. Association of Hemophilia clinic directors of Canada. *Haemophilia*. 1998;4(5):714-720.
16. Tuinenburg A, Mauser-Bunschoten EP, Verhaar MC, Biesma DH, Schutgens R. Cardiovascular disease in patients with haemophilia. *J Thromb Haemost*. 2009;7(2):247-254.
17. Reitter S, Waldhoer T, Vutuc C, et al. Survival in a cohort of patients with haemophilia at the haemophilia care center in Vienna, Austria, from 1983 to 2006. *Haemophilia*. 2009;15(4):888-893.
18. Witmer CM. Witmer Low mortality from intracranial haemorrhage in paediatric patients with haemophilia. *Haemophilia*. 2015;21(5):e359-e363.
19. Andersson NG, Auerswald G, Barnes C, et al. Intracranial haemorrhage in children and adolescents with severe haemophilia A or B—the impact of prophylactic treatment. *Br J Haematol*. 2017;179(2):298-307.
20. Arnold DM, Julian JA, Walker IR; Association of Hemophilia Clinic Directors of Canada. Mortality rates and causes of death among all HIV-positive individuals with hemophilia in Canada over 21 years of follow-up. *Blood*. 2006;108:460-464.
21. Schramm W, Rieger A. Morbidity and mortality of haemophilia patients in Germany. Survey results 2011/2012. *Hämostaseologie*. 2013;33:s5-s9.
22. Donald M, Arnold DM, Julian JA, Walker IR. Mortality rates and causes of death among all HIV-positive individuals with hemophilia in Canada over 21 years of follow-up. *Blood*. 2006;108:460-464.
23. Tagliaferri A, Rivolta G, Iorio A, et al. Mortality and causes of death in Italian persons with haemophilia, 1990-2007. *Haemophilia*. 2010;16(3):437-446.
24. Koumbarelis E, Rosendaal FR, Gialeraki A, et al. Epidemiology of haemophilia in Greece: an overview. *Thromb Haemost*. 1994;72(6):808-813.
25. Lima E, Queiroz BL. Evolution of the deaths registry system in Brazil: associations with changes in the mortality profile, under-registration of death counts, and ill-defined causes of death. *Cad Saude Publica*. 2014;30(8):1721-1730.

How to cite this article: Jardim LL, van der Bom JG, Caram-Deelder C, Gouw SC, Leal Cherchiglia M, Meireles Rezende S. Mortality of patients with haemophilia in Brazil: First report. *Haemophilia*. 2019;00:1-7. <https://doi.org/10.1111/hae.13730>



Variation of rs3754689 at lactase gene and inhibitors in admixed Brazilian patients with hemophilia A

by Luciana W. Zuccherato, Silvana M. Elói-Santos, Letícia L. Jardim, Ricardo M. Camelo, Daniel G. Chaves, Renan P. Souza, Edward J. Hollox, and Suely M. Rezende

Haematologica 2019 [Epub ahead of print]

Citation: Luciana W. Zuccherato, Silvana M. Elói-Santos, Letícia L. Jardim, Ricardo M. Camelo, Daniel G. Chaves, Renan P. Souza, Edward J. Hollox, and Suely M. Rezende.

Variation of rs3754689 at lactase gene and inhibitors in admixed Brazilian patients with hemophilia A.

Haematologica. 2019; 104:xxx

doi:10.3324/haematol.2019.220608

Publisher's Disclaimer.

E-publishing ahead of print is increasingly important for the rapid dissemination of science. Haematologica is, therefore, E-publishing PDF files of an early version of manuscripts that have completed a regular peer review and have been accepted for publication. E-publishing of this PDF file has been approved by the authors. After having E-published Ahead of Print, manuscripts will then undergo technical and English editing, typesetting, proof correction and be presented for the authors' final approval; the final version of the manuscript will then appear in print on a regular issue of the journal. All legal disclaimers that apply to the journal also pertain to this production process.

Variation of rs3754689 at lactase gene and inhibitors in admixed Brazilian patients with hemophilia A

Luciana W. Zuccherato¹, Silvana M. Elói-Santos¹, Letícia L. Jardim², Ricardo M. Camelo², Daniel G. Chaves³, Renan P. Souza⁴, Edward J. Hollox⁵ and Suely M. Rezende²

¹ Complementary Propedeutic Department, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

² Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

³ Fundação Hemominas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

⁴ Department of General Biology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

⁵ Department of Genetics and Genome Biology, University of Leicester, Leicester, United Kingdom

Short running title: Lactase gene and inhibitor development in hemophilia A.

Corresponding author:

Suely Meireles Rezende

Faculty of Medicine

Universidade Federal de Minas Gerais

Avenida Alfredo Balena, 190, room 255

Belo Horizonte - MG - ZIP. 30130-100

Phone/FAX: +55 31 34099933/45

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

Financial support: Fundo Nacional de Saúde (Ministry of Health, Grant number 25000.155761/2015-13), CAPES (Grant number 88881.068041/2014-01), CNPq (Grant number 456080/2014-7). LWZ and LLJ received fellowship from CAPES, DGC received a BIPDT fellowship from FAPEMIG.

Letters to the Editor

Hemophilia A is an X-linked bleeding disorder due to mutations in the factor VIII gene (*F8*). The most clinically relevant complication of hemophilia A is the development of neutralizing alloantibodies (inhibitors) against factor VIII¹, occurring in up to 30% of severe patients. Inhibitors impair hemostasis during FVIII replacement, leading to hemorrhages difficult to control, disability and decreased quality of life. The use of bypassing agents is required in most cases to treat or prevent bleeding, representing a more expensive and less effective alternative hemostatic therapy than exogenous FVIII².

Brazil has the fourth largest world population of hemophilia A, with approximately 10,000 individuals³ and a prevalence of 1:10,000 live males. Treatment of hemophilia represents a burden of 350 million dollars per year with the purchase of coagulation factor concentrates, of which about ¼ is annually expended for the treatment of immune tolerance induction and bleeding events for about 600 patients with clinically-relevant inhibitors⁴. Therefore, a predictive genetic marker of inhibitor development is highly needed. Several studies have attempted to unveil a predictive genetic marker of inhibitor development to be used in the clinical practice⁵. The most comprehensive study to date uncovered a set of genomic variants associated with inhibitor risk in a small cohort of Italian patients with hemophilia A using whole exome sequencing (WES) data⁶. They showed that the T allele of a SNP (rs3754689) in the lactase (*LCT*) gene, located in a conserved haplotype region, was associated with protection against FVIII alloantibodies (odds ratio 0.56; 95% confidence interval, 0.33-0.94). *LCT* encodes lactase-phlorizin hydrolase, responsible for the digestion of lactose with declining activity after weaning for most humans and all other mammals. Cis-acting allelic variants in an enhancer region upstream of *LCT* cause the persistence of lactase

into adulthood in multiple human populations, and these variants have been subjected to recent positive selection⁷.

We speculated whether this polymorphism would be suitable as a protective genetic marker of inhibitor development in an admixed Brazilian cohort of patients with hemophilia A. We enrolled individuals with severe (FVIII activity [FVIII:C] < 1%) and moderately-severe (FVIII:C 1%-2%) hemophilia A, who were genotyped for rs3754689 using Taqman (Id C_2104738_10; Thermo Fisher, Waltham, USA). Patients were participants from three different studies - the HEMFIL Study (n = 61)^{8,9} and the BrazIT Study (n = 55)¹⁰ - and from a local study which enrolled patients attending the Hemophilia Treatment Center in Minas Gerais state (n = 44). All patients/guardians signed an informed consent form and the studies were approved by local ethical committees.

Inhibitor status was defined as positive (Inh⁺) when inhibitor level was ≥ 0.6 Bethesda units (BU) per mL detected on two separate occasions within a 2–4 weeks' period. High titer inhibitors were considered as $> 5 \text{ BU mL}^{-1}$ at least once in a lifetime and low titer when inhibitors titers were always $\leq 5 \text{ BU mL}^{-1}$ ¹¹. Patients defined as negative for inhibitor (Inh⁻) were treated for at least 50 exposure days (ED) and did not develop inhibitors. Associations were evaluated using Pearson's chi-square test with simulated p-value implemented in R 3.4.4.

A total of 160 patients were included, of whom 149 had severe and 11 had moderately-severe hemophilia A. Eighty-six patients (53.7%) were Inh⁺, of whom 73 (84.9%) were high titer. Allelic frequency analysis showed no difference of rs3754689 between Inh⁺ and Inh⁻ groups (p= 0.931) nor between high and low titers (p= 0.386) (**Table 1**). No statistically significant deviations from expected Hardy Weinberg Equilibrium were observed (p = 0.999).

As expected, there was an association between the presence of *F8* intronic inversions (introns 1 and 22) and inhibitor status ($p=0.022$).

The same result was observed when rs3754689 genotypes of Inh^+ patients were compared with a large cohort ($n=5,822$) of healthy individuals from the EPIGEN Brazil Initiative ($p=0.792$). The EPIGEN represents a wide-range genomic landscape of Latin America, with around 2.2 million SNPs of three population-based Brazilian cohorts comprising diverse demographic studies¹². In a global populational overview, the diversity data from the 1,000 Genome Project¹³ shows an increased frequency of the protective T-allele in some groups, such as Europeans, Asians and mixed Americans (**Table 2**).

In light of the lack of association between rs3754689 and inhibitor development in our study, we investigated whether variants surrounding this particular variant in Brazilians showed association. To understand the genetic architecture of the *LCT* region, a linkage disequilibrium analysis using PLINK was performed across 200 Mb flanking the rs3754689 variant in 5,822 individuals from the EPIGEN cohort. Alleles at 321 SNPs associated to form 19 different haplotypes in the Brazilian population. A previous investigation of the polymorphisms related to lactase persistence in 981 healthy Brazilians revealed 26 haplotypes, with the most common persistent allele highly associated with European ancestry in the populations analyzed¹⁴. This is not an unexpected finding considering the high genetic variability of the Brazilian population.

Indeed, admixed populations such as Brazilians represent a prolific environment for genetic association studies due to its peculiar demographic history. From the last 500 years, the genetic compounds of Europeans and Africans were absorbed to the autochthonous Native American population, leading to a diversity pattern with differential admixture signatures

along the country¹⁵. The frequencies of the rs3754689 in the three cohorts of the EPIGEN illustrate it, with decreased frequency in the cohort of Salvador (Bahia state), where individuals have a strong African ancestry (**Table 2**).

The lack of association in our study demonstrates important issues to be addressed in the genetic features implicated in inhibitor development in hemophilia A. Firstly, genetic markers are not necessarily involved in the pathogenesis but linked to a genomic and population structure. Secondly, more admixture populations should be included in the studies to avoid apocryphal genomic markers. Although hemophilia A is a monogenic disease, the phenotype of inhibitor development has multidimensional features.

Underestimating the genetic diversity of the patients with hemophilia A might implicate in a subset of biological markers unsuited for admixed patients or population with a diverse demographic history.

In conclusion, in our population of severe/moderately-severe patients with hemophilia A, the SNP rs3754689 was not shown to be protective of inhibitor development.

Conflict of Interest Statement: The authors have no conflict of interest to declare.

Author Contributions: LWZ performed the research, analyzed the data and wrote the paper; SMES contributed with study design; LLJ, RMC and DGC included the patients and collected clinical data; RPS contributed with data analysis; EJH contribute with data analysis and wrote the paper; LWZ and SMR designed the research, contributed to data analysis and wrote the paper. All authors critically revised the manuscript and approved the final version.

Acknowledgments: We thank Dr. Eduardo Tarazona Santos and the EPIGEN group for providing access to the lactase locus data.

References

1. Garagiola I, Palla R, Peyvandi F. Risk factors for inhibitor development in severe hemophilia a. *Thromb Res.* 2018;168:20-27.
2. D'Angiolella LS, Cortesi PA, Rocino A, et al. The socioeconomic burden of patients affected by hemophilia with inhibitors. *Eur J Haematol.* 2018;101(4):435-456.
3. Report on the Annual Global Survey 2017. World Federation of Hemophilia. 2018.
4. Rezende SM, Rodrigues SH, Brito KN, et al. Evaluation of a web-based registry of inherited bleeding disorders: a descriptive study of the Brazilian experience with HEMOVIDAweb Coagulopatias. *Orphanet J Rare Dis.* 2017;12(1):27.
5. Astermark J. FVIII inhibitors: pathogenesis and avoidance. *Blood.* 2015;125(13):2045-2051.
6. Gorski MM, Blighe K, Lotta LA, et al. Whole-exome sequencing to identify genetic risk variants underlying inhibitor development in severe hemophilia A patients. *Blood.* 2016;127(23):2924-2933.
7. Segurel L, Bon C. On the Evolution of Lactase Persistence in Humans. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2017;18:297-319.
8. Jardim LL, Chaves DG, Silveira-Cassette ACO, et al. Immune status of patients with haemophilia A before exposure to factor VIII: first results from the HEMFIL study. *Br J Haematol.* 2017;178(6):971-978.
9. Jardim LL, van der Bom J, Brommonschenkel CC, Gouw SC, Rezende SM, on the behalf of the HSG. Inhibitor incidence in haemophilia A under exclusive use of a third-generation recombinant factor VIII concentrate: results of the HEMFIL Cohort Study. *Br J Haematol.* 2018 Dec 17. [Epub ahead of print]
10. Camelo R, Magalhaes L, Jardim L, et al. Immune Tolerance Induction in Patients with Hemophilia A and Inhibitors: Preliminary Results of the Brazilian Immune Tolerance (BrazIT) Study. *Res Pract Thromb Haemost.* 2018;2(Suppl. 1):97-98.
11. Blanchette VS, Key NS, Ljung LR, et al. Definitions in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2014;12(11):1935-1939.
12. Kehdy FS, Gouveia MH, Machado M, et al. Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(28):8696-8701.

13. Genomes Project C, Auton A, Brooks LD, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68-74.
14. Friedrich DC, Santos SE, Ribeiro-dos-Santos AK, Hutz MH. Several different lactase persistence associated alleles and high diversity of the lactase gene in the admixed Brazilian population. *PLoS One*. 2012;7(9):e46520.
15. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(1):177-182.

Table 1. Characteristics of the patients included in the study.

Characteristic	All patients	Inhibitor	No inhibitor
Severity of hemophilia A, n (%)			
Severe	149	83 (56)	66 (44)
Moderately-severe	11	3 (27)	8 (73)
rs3754689 genotype, n			
T/T	16	8	8
T/C	75	40	35
C/C	69	38	31
Inhibitor titer, n (%)			
High titer	-	73 (85)	-
Low titer	-	13 (15)	-
F8 genotype, n (%)			
Inv1+	7	5 (71)	2 (29)
Inv22-1+	41	31 (76)	10 (24)
Inv22-2+	19	15 (79)	4 (21)
Inv1/22 negative*	67	34 (51)	33 (49)
Not available	26	1 (4)	25 (96)

*Individuals who tested negative for inversions of introns 1 and 22 of *F8*.

Table 2. Allelic frequencies of SNP rs3754689 in Brazilian and Italian patients with hemophilia A, cohort EPIGEN Brazil and 1,000 Genome data from the five major human population groups.

Groups	Frequency		Population	Frequency	
	C	T		C	T
Brazilian HA patients (n= 160)	0.67	0.33	Inh ⁺ (n= 86)	0.67	0.33
			Inh ⁻ (n= 74)	0.66	0.34
EPIGEN Brazil ¹⁸ (n= 5,822)	0.68	0.32	Salvador (n= 1,246)	0.61	0.39
			BambuÍ (n= 925)	0.72	0.28
			Pelotas (n= 3,651)	0.70	0.30
			BambuÍ + Pelotas (n= 4,576)	0.70	0.30
Italian HA patients ¹² (n= 253)	-	-	Inh ⁺ exome (n= 17)	0.68	0.32
			Inh ⁻ exome (n= 9)	0.56	0.44
			Inh ⁺ (n= 53)	0.74	0.26
			Inh ⁻ (n= 174)	0.62	0.38
Africans	0.46	0.54	Yoruba Ibadan, Nigeria	0.41	0.59
			Luhya Webuye, Kenya	0.44	0.56
			Gambian, Western Divisions, Gambia	0.44	0.56
			Mende, Sierra Leone	0.41	0.59
			Esan, Nigeria	0.49	0.51
			Americans African Ancestry, USA	0.57	0.43
			African Caribbeans, Barbados	0.47	0.53
Europeans	0.78	0.22	Utah Residents (CEPH) Northern and Western European Ancestry	0.88	0.12
			Toscani, Italia	0.57	0.43
			Finnish, Finland	0.84	0.16
			British, England and Scotland	0.84	0.16
			Iberian Population, Spain	0.79	0.21
East Asians	0.63	0.37	Han Chinese, Beijing, China	0.56	0.44
			Japanese, Tokyo, Japan	0.78	0.22
			Southern Han Chinese	0.56	0.44
			Chinese Dai, Xishuangbanna, China	0.64	0.36
			Kinh, Ho Chi Minh City, Vietnam	0.60	0.40
South Asians	0.71	0.28	Gujarati Indian, Houston, Texas	0.74	0.26
			Punjabi from Lahore, Pakistan	0.76	0.24
			Bengali, Bangladesh	0.69	0.31
			Sri Lankan Tamil, UK	0.67	0.33
			Indian Telugu, UK	0.72	0.28
Mixed Americans	0.74	0.26	Mexican Ancestry, Los Angeles, USA	0.77	0.23
			Puerto Ricans, Puerto Rico	0.68	0.32
			Colombians, Medellin, Colombia	0.70	0.30
			Peruvians, Lima, Peru	0.82	0.18

Inh+, patients with inhibitor; Inh-, patients without inhibitor; HA, hemophilia A.

Atualmente, o estudo HEMFIL possui 101 pacientes incluídos, dos quais 11 com hemofilia B (HB) e 90 com hemofilia A (HA). Dos pacientes com HA, 5 apresentam o fenótipo leve da doença ($>5\%$), 3 apresentam a forma moderada ($FVIII:C > 2\%-5\%$) e 82 pacientes apresentam HA grave/moderadamente grave ($FVIII:C < 2\%$). Destes, 71 pacientes completaram o acompanhamento, atingindo o tempo T1, ou seja, 75DE, dos quais 30 pacientes desenvolveram inibidor (T1/Inibidor) e 41 pacientes completaram 75 DE sem desenvolvimento de inibidor. A incidência acumulada para o desenvolvimento de inibidor foi de 36,0% (IC 95%, 25,2-48,5), dos quais 25,0% (IC 95%, 15,6-37,9) desenvolveram inibidores de alto título. Os resultados deste tópico foram publicados no British Journal of Haematology em 2019 (Jardim *et al*, 2019).

Apesar de não ter sido objetivo da tese, a aluna de doutorado trabalhou em um dos objetivos do estudo HEMFIL, que se baseava em avaliar o perfil imunológico dos pacientes incluídos no estudo antes do início do tratamento com concentrado de fator VIII e comparar os marcadores imunológicos entre os grupos de pacientes que desenvolveram inibidor aos que não desenvolveram. Os resultados das dosagens de citocinas e quimiocinas em 40 pacientes no momento T0 foi publicado em 2017 (Jardim *et al*, 2017). De acordo com este artigo, quando comparado a controles sem HA, pacientes com HA apresentam um perfil imunológico pró-inflamatório regulado por IL-4 e IL-10 previamente a qualquer infusão de concentrado de FVIII, (Jardim *et al*, 2017).

Para investigar o efeito das primeiras infusões de FVIII em biomarcadores imunológicos de crianças com HA congênita, avaliamos 70 pacientes com HA grave ($FVIII < 1\%$) do estudo HEMFIL. As amostras de plasma foram coletadas no momento da inclusão e durante o tratamento até 75 DE ou desenvolvimento de inibidor. As amostras foram divididas em três grupos, considerando o ED ao FVIII na coleta de sangue: antes de qualquer exposição (T0); 1-35 ED; e >35 ED. Os anticorpos anti-FVIII específicos (IgM, IgG1, IgG3, IgG4), as quimiocinas (CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10) e as citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN-gama, TNF, IL-17) foram avaliados. A mediana de idade dos pacientes incluídos no estudo foi de 10,0 meses (IQR, 6,0-14,0). Das 70 crianças incluídas, 27 (38,6%) desenvolveram inibidor, dos quais 17 eram de alto título. O tempo médio para o desenvolvimento de inibidores foi de 13,0 ED (IQR, 8,5-18,0). Todos os pacientes incluídos foram tratados com Advate® (Shire, EUA). Pacientes com inibidores apresentaram níveis aumentados de IgG4 anti-FVIII específico no estrato 1-35 ED em comparação com T0 ($p < 0,01$). No estrato 1-35 ED, a concentração plasmática de IL-6 ($p < 0,01$) e CXCL8 ($p = 0,02$) foi maior em comparação com pacientes que não desenvolveram inibidores. Em contrapartida, os pacientes que não desenvolveram inibidores apresentaram um perfil misto de citocinas e níveis plasmáticos mais elevados de CXCL9 ($p < 0,01$) e CXCL10 ($p < 0,01$) no

estrato 1-35 DE. Pacientes com inibidores apresentaram baixo número de correlação entre quimiocinas e citocinas em T0. No entanto, um rearranjo de conexões ocorre nos primeiros 35 de exposição ao FVIII ($r > 0,68$). Estes resultados foram submetidos em forma de artigo científico.

Considerando as análises genéticas do estudo HEMFIL, até o presente momento, foram identificadas mutações em F8 em 73 (81%) pacientes com HA incluídos no estudo, das quais 1% e 49% são inversões dos íntrons 1 e 22, respectivamente. Um total de 18/73 (25%) são mutações de sentido trocado, 4 (5%) grandes deleções, 5 (7%) inserções/deleções, 6 (8%) mutações sem sentido e 2 (3%) em regiões de processamento. A análise de frequência alélica não mostrou diferença do polimorfismo rs3754689 entre os grupos de pacientes com inibidor positivo e negativo ($p = 0,931$), nem entre os títulos de inibidor alto e baixo ($p = 0,386$).

Conclusão

A incidência acumulada do desenvolvimento de inibidores em uso exclusivo de fator VIII recombinante de terceira geração foi de 36% para todos os inibidores e 27% para inibidores de alto título. Apesar de ser a maior complicação que acomete os pacientes com hemofilia atualmente, o motivo que leva ao desenvolvimento de inibidores ainda é desconhecido. Análises preliminares do estudo HEMFIL sugerem que os primeiros dias de exposição ao concentrado de fator VIII podem modular uma resposta imunológica favorável ao desenvolvimento de anticorpos. Para confirmação desses achados, o estudo irá avaliar biomarcadores genéticos e imunológicos como potenciais fatores de risco independentes para proteção/risco de desenvolvimento de inibidores através de análise multivariada. Ainda, esta tese demonstrou, pela primeira vez, que a mortalidade dos pacientes com hemofilia reduziu ao longo dos anos no Brasil e que, com o aumento da expectativa de vida desses pacientes, começamos a observar o desenvolvimento de doenças comumente relacionadas ao envelhecimento, como doenças cardiovasculares e câncer, seguindo a mesma tendência relatada em artigos de países desenvolvidos. Entretanto, a hemorragia intracraniana ainda se apresentou como uma importante causa de morte nos pacientes com hemofilia A e B.

Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, Horst J, de Moerloose P, Sommer SS, Ketterling RP, Kazazian HH Jr, Négrier C, Vinciguerra C, Gitschier J, Goossens M, Girodon E, Ghanem N, Plassa F, Lavergne JM, Vidaud M, Costa JM, Laurian Y, Lin SW, Lin SR, Shen MC, Lillicrap D, Taylor SA, Windsor S, Valleix SV, Nafa K, Sultan Y, Delpech M, Vnencak-Jones CL, Phillips JA 3rd, Ljung RC, Koumbarelis E, Gialeraki A, Mandalaki T, Jenkins PV, Collins PW, Pasi KJ, Goodeve A, Peake I, Preston FE, Schwartz M, Scheibel E, Ingerslev J, Cooper DN, Millar DS, Kakkar VV, Giannelli F, Naylor JA, Tizzano EF, Baiget M, Domenech M, Altisent C, Tusell J, Beneyto M, Lorenzo JL, Gaucher C, Mazurier C, Peerlinck K, Matthijs G, Cassiman JJ, Vermynen J, Mori PG, Aquila 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, 1995.

Arnold DM, Julian JA, Walker IR; Association of Hemophilia Clinic Directors of Canada. Mortality rates and causes of death among all HIV-positive individuals with hemophilia in Canada over 21 years of follow-up. *Blood*. 15;108(2):460-4, 2006.

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

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

Behrmann M, Pasi J, Saint-Remy JM, Kotitschke R, Kloft M. Von Willebrand factor modulates factor VIII immunogenicity: comparative study of different factor VIII concentrates in a haemophilia A mouse model. *Thromb Haemost*. 88(2):221-229, 2002.

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

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

Calvez T, Chambost H, d'Oiron R, Dalibard V, Demiguel V, Doncarli A, Gruel Y, Huguenin Y, Lutz P, Rothschild C, Vinciguerra C, Goudemand J; for FranceCoag Collaborators. Analyses of the FranceCoag cohort support differences in immunogenicity among one plasma-derived and two recombinant factor VIII brands in boys with severe hemophilia A. *Haematologica*. 103(1):179-189, 2018.

Chang CY, Yeh GC, Lin SY, Tseng IJ, Tsai CH, Lee YW. Trends in the epidemiology, diagnosed age and mortality rate of haemophiliacs in Tawan: a population-based study, 1997-2009. *Haemophilia*. 20(4):535-40, 2014.

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

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

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

Chorba TL, Holman RC, Clarke M, Evatt BL, Effects of HIV Infection on Age and Cause of Death for Persons With Hemophilia A in the United States. *American Journal of Hematology*. 66:229–240, 2001.

Collins P, Palmer B, Chalmers E, Hart DP, Liesner R, Rangarajan S, Talks K, Williams M, Hay CR; UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. Factor VIII brand and the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated UK children with severe hemophilia A, 2000-2011. *Blood*. 124(23): 3389–3397, 2014.

Darby SC, Kan SW, Spooner RJ, Giangrande PL, Hill FG, Hay CR, Lee CA, Ludlam CA, Williams M. Mortality rates, life expectancy, and causes of death in people with hemophilia A or B in the United Kingdom who were not infected with HIV. *Blood*. 1;110(3):815-25, 2007.

Dasgupta S, Repessé Y, Bayry J, Navarrete AM, Wootla B, Delignat S, Irinopoulou T, Kamaté C, Saint-Remy JM, Jacquemin M, Lenting PJ, Borel-Derlon A, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. VWF protects FVIII from endocytosis by dendritic cells and subsequent presentation to immune effectors. *Blood*. 15;109(2):610-2, 2007.

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

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

Delignat S, Repessé Y, Navarrete AM, Meslier Y, Gupta N, Christophe OD, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. Immunoprotective effect of von Willebrand factor towards therapeutic factor VIII in experimental haemophilia A. *Haemophilia*. 18(2):248-54, 2012.

Donald M, Arnold dm, Julian ja and Walker ir. Mortality rates and causes of death among all hiv-positive individuals with hemophilia in Canada over 21 years of follow-up. *Blood*. 108, 2, 2006.

Ehrenforth S, Kreuz W, Scharrer I, Linde R, Funk M, Güngör T, Krackhardt B, Kornhuber B. Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs. *Lancet*. 7;339(8793):594-8, 1992.

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

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

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

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

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

Gouw SC, van den Berg HM, Oldenburg J, Astermark J, de Groot PG, Margaglione M, Thompson AR, van Heerde W, Boekhorst J, Miller CH, le Cessie S, van der Bom JG. F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood*. 22;119(12):2922-34, 2012.

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

Gouw SC, van der Bom JG, Ljung R, Escuriola C, Cid AR, Claeysens-Donadel S, van Geet C, Kenet G, Mäkipernaa A, Molinari AC, Muntean W, Kobelt R, Rivard G, Santagostino E, Thomas A, van den Berg HM. Factor VIII products and inhibitor development in severe hemophilia A. *N Engl J Med*. v. 368. p. 231–9, 2013b.

Green D, Lechner K. A survey of 215 non-hemophilic patients with inhibitors to Factor VIII. *Thromb Haemost*. 30;45(3):200-3, 1981.

Gunasekera D, Ettinger RA, Nakaya Fletcher S, James EA, Liu M, Barrett JC, Withycombe J, Matthews DC, Epstein MS, Hughes RJ, Pratt KP; Personalized Approaches to Therapies for Hemophilia (PATH) Study Investigators. Factor VIII gene variants and inhibitor risk in African American hemophilia A patients. *Blood*. 13;126(7):895-904, 2015.

Hay CR, Ollier W, Pepper L, Cumming A, Keeney S, Goodeve AC, Colvin BT, Hill FG, Preston FE, Peake IR. HLA class II profile: a weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe haemophilia A. UKHCDO Inhibitor Working Party. *Thromb Haemost*. 77(2):234-237, 1997.

Hoyer, L.W. Hemophilia A. *N Engl J Med*. 330(1):38-47, 1994.

Iorio A, Halimeh S, Holzhauser S, Goldenberg N, Marchesini E, Marcucci M, Young G, Bidlingmaier C, Brandao LR, Ettingshausen CE, Gringeri A, Kenet G, Knöfler R, Kreuz W, Kurnik K, Manner D, Santagostino E, Mannucci PM, Nowak-Göttl U. Rate of inhibitor development in previously untreated hemophilia A patients treated with plasma-derived or recombinant factor VIII concentrates: a systematic review. *J Thromb Haemost*. 8(6):1256-65, 2010.

Jardim LL, Chaves DG, Silveira-Cassette ACO, Simões E Silva AC, Santana MP, Cerqueira MH, Prezotti A, Lorenzato C, Franco V, van der Bom JG, Rezende SM. Immune status of patients with haemophilia A before exposure to factor VIII: first results from the HEMFIL study. *British journal of haematology*. 178(6):971-978, 2017.

Jardim LL, van der Bom JG, Caram-Deelder C, Gouw SC, Leal Cherchiglia M, Meireles Rezende S. Mortality of patients with haemophilia in Brazil: First report. *Haemophilia*. (3):e146-e152, 2019

Jardim LL, van der Bom J, Brommonschenkel CC, Gouw SC, Rezende SM; on the behalf of the HEMFIL Study Group. Inhibitor incidence in haemophilia A under exclusive use of a third-generation recombinant factor VIII concentrate: results of the HEMFIL Cohort Study. *Br J Haematol.* 186(1):152-155, 2019.

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

Koumbarelis E, Rosendaal FR, Gialeraki A, Karafoulidou A, Noteboom WM, Loizou C, Panayotopoulou C, Markakis C, Mandalaki T. Epidemiology of haemophilia in Greece: an overview. *Thromb Haemost.* 72(6):808-13, 1994.

Krudysz-Amblo J, Parhami-Seren B, Butenas S, Brummel-Ziedins KE, Gomperts ED, Rivard GE, Mann KG. Quantitation of anti-factor VIII antibodies in human plasma. *Blood.* 113(11): p. 2587-94, 2009.

Lai J, Hough C, Tarrant J, Lillicrap D. Biological considerations of plasma-derived and recombinant factor VIII immunogenicity. *Blood.* 129(24):3147-3154, 2017.

Larsson SA. Life expectancy of Swedish haemophiliacs, 1831–1980. *Br J Haematol.* 59: 593–602, 1985.

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

Lozier JN, Rosenberg PS, Goedert JJ, Menashe I. A case-control study reveals immunoregulatory gene haplotypes that influence inhibitor risk in severe haemophilia A. *Haemophilia.* 17(4):641-649, 2011.

Lu Y, Ding Q, Dai J, Wang H, Wang X. Impact of polymorphisms in genes involved in autoimmune disease on inhibitor development in Chinese patients with haemophilia A. *Thromb Haemost.* 107(1):30-36, 2012.

Manco-Johnson MJ, Abshire TC, Shapiro AD, Riske B, Hacker MR, Kilcoyne R, Ingram JD, Manco-Johnson ML, Funk S, Jacobson L, Valentino LA, Hoots WK, Buchanan GR, DiMichele D, Recht M, Brown D, Leissinger C, Bleak S, Cohen A, Mathew P, Matsunaga A, Medeiros D, Nugent D, Thomas GA, Thompson AA, McRedmond K, Soucie JM, Austin H, Evatt BL. Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia. *N Engl J Med.* 357(6):535-44, 2007.

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

Ministério da Saúde. Hemofilia Congênita e Inibidor: Manual de Diagnóstico e Tratamento de Eventos Hemorrágicos, 2015.

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

Oldenburg J, EL-Maarri O, Schwaab R. Inhibitor development in correlation to factor VIII genotypes. *Haemophilia*, 8: 23-9, 2002.

Ordi Ros J, Altisent Roca C. Hemofilia adquirida. *Medicina Clínica*. 2002;119(20):773-775

Pavlova A, Delev D, Lacroix-Desmazes S, Schwaab R, Mende M, Fimmers R, Astermark J, Oldenburg J. Impact of polymorphisms of the major histocompatibility complex class II, interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A. *J Thromb Haemost*. 7(12):2006-2015, 2009.

Peyvandi F, Mannucci PM, Garagiola I, El-Beshlawy A, Elalfy M, Ramanan V, Eshghi P, Hanagavadi S, Varadarajan R, Karimi M, Mangani MV, Ross C, Young G, Seth T, Apte S, Nayak DM, Santagostino E, Mancuso ME, Sandoval Gonzalez AC, Mahlangu JN, Bonanad Boix S, Cerqueira M, Ewing NP, Male C, Owaidah T, Soto Arellano V, Kobrinsky NL, Majumdar S, Perez Garrido R, Sachdeva A, Simpson M, Thomas M, Zanon E, Antmen B, Kavakli K, Manco-Johnson MJ, Martinez M, Marzouka E, Mazzucconi MG, Neme D, Palomo Bravo A, Paredes Aguilera R, Prezotti A, Schmitt K, Wicklund BM, Zulfikar B, Rosendaal FR. A randomized trial of factor VIII and neutralizing antibodies in hemophilia A. *N Engl J Med*. 374(21):2054–2064, 2016.

Pinto P, Ghosh K and Shetty S. Immune regulatory gene polymorphisms as predisposing risk factors for the development of factor VIII inhibitors in Indian severe haemophilia A patients. *Haemophilia*. 18(5):794-797, 2012.

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

Pio SF, Oliveira GC, Soares S, Rezende SM. An aberrant pattern for intron 1 inversion of factor VIII gene. *Haemophilia*. 17(4):708-9, 2011.

Plug I, Van Der Bom JG, Peters M, Mauser-Bunschoten EP, De Goede-Bolder A, Heijnen L, Smit C, Willemse J, Rosendaal FR.. Mortality and causes of death in patients with hemophilia, 1992-2001: a prospective cohort study. *J Thromb Haemost*. 4: 510–6, 2006.

Reding MT, Lei S, Lei H, Green D, Gill J, Conti-Fine BM. Distribution of Th1- and Th2-induced anti-factor VIII IgG subclasses in congenital and acquired hemophilia patients. *Thromb Haemost*. 88:568-75, 2002.

Reitter S, Waldhoer T, Vutuc C, Lechner K, Pabinger I. Survival in a cohort of patients with haemophilia at the haemophilia care center in Vienna, Austria, from 1983 to 2006. *Haemophilia*. 15(4):888-93, 2009.

Rezende SM, Pinheiro K, Caram C, Genovez G & Barca D. Registry of inherited coagulopathies in Brazil: first report. *Haemophilia*, 15(1), 142–149, 2009.

Rezende SM, Rodrigues SHL, Brito KNP, da Silva DL, Santo ML, Simões BJ, Genovez G, Melo HT, Araújo JP, Barca DA; HEMOVIDAweb Coagulopatias Study Group. Evaluation of a web-based registry of inherited bleeding disorders: a descriptive study of the Brazilian experience with HEMOVIDAweb Coagulopatias. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 10;12(1):27, 2017.

Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD. Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost.* 6(5):830-836, 2008.

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

Schramm W, Rieger, A. Morbidity and mortality of haemophilia patients in Germany Survey results 2011/2012. *Hämostaseologie* 4a, 2013.

Schwaab R, Brackmann HH, Meyer C, Seehafer J, Kirchgesser M, Haack A, Olek K, Tuddenham EG, Oldenburg J. Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. *Thrombosis and Haemostasis.* v.74, p. 1402-1406, 1995.

Sorvillo N, Hartholt RB, Bloem E, Sedek M, ten Brinke A, van der Zwaan C, van Alphen FP, Meijer AB, Voorberg J. von Willebrand factor binds to the surface of dendritic cells and modulates peptide presentation of factor VIII. *Haematologica.* 101(3):309-18, 2016.

Sun J, Yuan Z, Abajas YL, Szollosi DE, Hu G, Hua B, Xiao X, Li C. A Retrospective Study of the Cytokine Profile Changes in Mice with FVIII Inhibitor Development After Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Therapy in a Hemophilia A Mouse Model. *Hum Gene Ther.* 29(3):381-389, 2018.

Tagliaferri A, Rivolta G, Iorio A, Olivoecchio E, Mancuso ME, Morfini M, Rocino A, Mazzucconi MG, Franchini M; Italian Association of Hemophilia Centers, Ciavarella N, Scaraggi A, Valdrè L, Tagariello G, Radossi P, Muleo G, Iannaccaro PG, Biasoli C, Vincenzi D, Serino ML, Linari S, Molinari C, Boeri E, La Pecorella M, Carloni MT, Santagostino E, Di Minno G, Coppola A, Rocino A, Zanon E, Spiezia L, Di Perna C, Marchesini M, Marcucci M, Dragani A, Macchi S, Albertini P, D'Incà M, Santoro C, Biondo F, Piseddu G, Rossetti G, Barillari G, Gandini G, Giuffrida AC, Castaman G. Mortality and causes of death in Italian persons with haemophilia, 1990-2007. *Haemophilia.* 16(3):437-46, 2010.

Ter Avest PC, Fischer K, Mancuso ME, Santagostino E, Yuste VJ, van den Berg HM, van der Bom JG. Risk stratification for inhibitor development at first treatment for severe hemophilia A: a tool for clinical practice. *J ThrombHaemost.* 6: 2048–54, 2008.

Tuinenburg A, Mauser-Bunschoten EP, Verhaar MC, Biesma DH, Schutgens REG. Cardiovascular disease in patients with haemophilia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 7: 247–254, 2009.

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

Viel KR, Ameri A, Abshire TC, Iyer RV, Watts RG, Lutchner C, Channell C, Cole SA, Fernstrom KM, Nakaya S, Kasper CK, Thompson AR, Almasy L, Howard TE. Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia. *N Engl J Med.* v. 360. p. 1618-27, 2009.

Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Dias JC, Pascoal VP, Teixeira- Carvalho A, Lage PS, Eloi-Santos SM, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA. Chagasic patients with indeterminate clinical

form of the disease have high frequencies of circulating CD3⁺CD16⁺CD56⁺ natural killer T cells and CD4⁺CD25⁺ High regulatory T lymphocytes. *Scand J Immunol.* v. 62. p. 297–308, 2005.

Walker IR, Julian JA. Causes of death in Canadians with haemophilia 1980-1995. Association of Hemophilia Clinic Directors of Canada. *Haemophilia.* 4(5):714-20, 1998.

Walsh CE, Soucie JM, Miller CH. Impact of inhibitors on hemophilia A mortality in the United States. *Am. J. Hematol.* 90:400–405, 2015.

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

Whelan SF, Hofbauer CJ, Horling FM, Allacher P, Wolfsegger MJ, Oldenburg J, Male C, Windyga J, Tiede A, Schwarz HP, Scheiflinger F, Reipert BM. Distinct characteristics of antibody responses against factor VIII in healthy individuals and in different cohorts of hemophilia A patients. *Blood.* 121(6): p. 1039-48, 2013.

Witmer CM. Witmer Low mortality from intracranial haemorrhage in paediatric patients with haemophilia. *Haemophilia.* 21(5):e359-63, 2015.

White G, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J; Factor VIII and Factor IX Subcommittee. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost.* v. 85. p. 560, 2001.

World Federation of Haemophilia; Annual Global Survey 2016. pp 80, 2017. <https://www1.wfh.org/publication/files/pdf-1690.pdf>

Zuccherato LW, Elói-Santos SM, Jardim LL, Camelo RM, Chaves DG, Souza RP, Hollox EJ, Rezende SM. variation of RS3754689 at lactase gene and Inhibitors in admixed Brazilian patients with Hemophilia A. *Haematologica.* 2019 mar 14. PII: haematol.2019.220608

RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS:

2019

1. **JARDIM LL**, CHAVES DG, SANTANA MP, CERQUEIRA MH, PREZOTTI A, LORENZATO CS, FRANCO VKB, Van der Bom JG, REZENDE SM. Inhibitor incidence in hemophilia A under exclusive use of a third-generation recombinant factor VIII concentrate: results of the HEMFIL Cohort Study. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Austrália Evento: ISTH 2019 Congress, 2019 – **Resumo contemplado com o prêmio Reach the World Award Grant.**
2. **JARDIM LL**, PEREIRA LS, FRANCO MB, OLIVEIRA NR, RIBEIRO DD, REZENDE SM. Clinical and laboratory profile of the bleeding diathesis in Yellow Fever infection. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Austrália Evento: ISTH 2019 Congress, 2019
3. **JARDIM LL**, PEREIRA LS, FRANCO MB, OLIVEIRA NR, RIBEIRO DD, REZENDE SM. Effects of acute liver failure of Yellow Fever infection on haemostasis assessed by thromboelastometry. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Austrália Evento: ISTH 2019 Congress, 2019

2018

1. **JARDIM LL**, CHAVES DG, BROMMONSCHENKEL, CC SANTANA MP, CERQUEIRA MH, PREZOTTI A, LORENZATO CS, FRANCO VKB, Van der Bom JG, REZENDE SM. Inhibitor incidence in hemophilia A under exclusive use of a third-generation recombinant factor VIII concentrate: results of the HEMFIL Cohort Study. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: São Paulo / Brasil; Evento: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2018.
2. **JARDIM LL**, CHAVES DG, BROMMONSCHENKEL, CC SANTANA MP, CERQUEIRA MH, PREZOTTI A, LORENZATO CS, FRANCO VKB, Van der Bom JG, REZENDE SM. Inhibitor incidence in hemophilia A under exclusive use of a third-generation recombinant factor VIII concentrate: results of the HEMFIL Cohort Study. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Dublin / Irlanda; Evento: ISTH 2018 Congress, 2018 – **Resumo contemplado com o prêmio Reach the World Award Grant.**

2017

1. **JARDIM LL**, CHAVES DG, BROMMONSCHENKEL, CC SANTANA MP, CERQUEIRA MH, PREZOTTI A, LORENZATO CS, FRANCO VKB, REZENDE SM. Clinical characteristics of patients with hemophilia a and b: preliminary results of the HEMFIL cohort study. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Curitiba / Brasil; Evento: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2017.
2. **JARDIM LL**, CHAVES DG, SILVEIRA-CASSETTE AC, SILVA ACSE, SANTANA MP, CERQUEIRA MH, PREZOTTI A, LORENZATO CS, BOM JVD, REZENDE SM. Immunological Profile of Previously Untreated Patients With Haemophilia A: Results from the HEMFIL Study. Referências adicionais: Inglês. Impresso; Local: Curitiba / Brasil; Evento: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2017

2016

1. JARDIM LL, CHAVES DG, SILVEIRA-CASSETTE AC, SILVA ACSE, SANTANA MP, CERQUEIRA MH, PREZOTTI A, LORENZATO CS, BOM JVD, REZENDE SM. Immunological Profile of Previously Untreated Patients With Haemophilia A: Results from the HEMFIL Study. Referências adicionais: Inglês. Impresso; Local: Florianópolis; Evento: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2016

2. JARDIM LL, CHAVES DG, SILVEIRA-CASSETTE AC, SILVA ACSE, SANTANA MP, CERQUEIRA MH, PREZOTTI A, LORENZATO CS, BOM JVD, REZENDE SM. Immunological Profile of Previously Untreated Patients With Haemophilia A: Results from the HEMFIL Study. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Montpellier / França; Evento: SSC ISTH 2016 – **Resumo contemplado com os prêmios Reach the World Grant e Milwaukee SSC Award (The highest scored Reach the World abstracts).**

2015

1. JARDIM, L. CHAVES, D., SANTANA, M., KUETTAL, L., PREZOTTI, A., CERQUEIRA, M., LORENZATO, C., REZENDE, S. Avaliação do perfil imunológico de pacientes com hemofilia recém-diagnosticada. Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: São Paulo / SP; Evento: XXIV Congresso Internacional do Grupo Claht - CLAHT 2015 – **Resumo selecionado para visita guiada por estar entre os 2 melhores trabalhos da sua especialidade.**

2. JARDIM, L. CHAVES, D., SANTANA, M., KUETTAL, L., PREZOTTI, A., CERQUEIRA, M., LORENZATO, C., REZENDE, S. Analysis of the profile of chemokines, cytokines and microparticles in Previously Untreated Patients with Hemophilia A. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: São Paulo; Evento: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2015

3. JARDIM, L. CHAVES, D., SANTANA, M., KUETTAL, L., PREZOTTI, A., CERQUEIRA, M., LORENZATO, C., REZENDE, S. Analysis of the profile of immune cells, cytokines and chemokines in previously untreated patients with hemophilia. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Toronto / Canadá; Evento: ISTH 2015 Congress, 2015 – **Resumo contemplado com o prêmio Reach the World Award Grant.**

2014

1. JARDIM, L. CHAVES, D., PORTUGAL, M., KUETTAL, L., PREZOTTI, A., CERQUEIRA, M., LORENZATO, C., REZENDE, S. Avaliação do perfil imunológico de pacientes com hemofilia recém-diagnosticada. 2014. Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Florianópolis; Evento: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2014

Termo de consentimento assinado?

- ☐ Sim
☐ Não →

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

A. Características gerais

1. Data da avaliação inicial

2. Paciente (nome e sobrenome completo):

3. Data de nascimento

4. Sexo

- ☐ Masculino
☐ Feminino

5. Origem étnica (auto-definição)

- ☐ Branco
☐ Negro de origem africana
☐ Negro de outra origem
☐ Asiático
☐ Outro

Qual:

Local de nascimento do paciente:

- ☐ Brasil
☐ outro país.

Qual:

Local de nascimento do pai:

- ☐ Brasil
☐ outro país.

Qual:

Local de nascimento da mãe:

- ☐ Brasil
☐ outro país.

Qual:

Local de nascimento do avô materno:

- ☐ Brasil
☐ outro país.

Qual:

A. Características gerais (continuação)

Local de nascimento da avó materna:

Brasil
outro país.

Qual:

Local de nascimento do avô paterno:

☐ Brasil
☐ outro país.

Qual:

Local de nascimento da avó paterna:

☐ Brasil
☐ outro país.

Qual:

6. Tipo de hemofilia

☐ A
☐ B

7. Atividade residual do fator de coagulação

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

Dosagem de atividade

FVIII / IX:C

FVIII/IX:Ag

% Data:

% ou ☐ não conhecido/ não dosado

8. Possui irmão gêmeo com a mesma deficiência?

☐ Sim
☐ Não

9. Grupo sanguíneo

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

10. Mutação conhecida?

☐ Sim
☐ Não

Se sim, inversão do intron 22

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

B. Histórico médico do paciente

1. Tipo de parto

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

a. Se parto normal

- ☐ Natural
☐ Fórceps
☐ Vácuo-extrator
☐ Não sabe ou não informa

b. Se cesariana: por causa da hemofilia?

- ☐ Sim
☐ Não
☐ Não sabe ou não informa

2. Idade da gestação no momento do parto

- semanas
☐ Não sabe ou não informa

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

- ☐ Sim
☐ Não
☐ Não sabe ou não informa

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

- ☐ Sim
☐ Não
☐ Não sabe ou não informa

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

- ☐ Sim
☐ Não
☐ Não sabe ou não informa

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

- ☐ Sim
☐ Não
☐ Não sabe ou não informa

a. Se sim, sintomático?

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

B. Histórico médico (continuação)

7. Tempo de amamentação exclusiva

semanas

☐ Amamentação ainda em andamento. Neste caso, após suspensão da amamentação, preencher o campo A.3 no formulário 2 de atualização

☐ Não sabe ou não informa

8. Data do diagnóstico da hemofilia

9. Motivo do diagnóstico

☐ Histórico familiar

☐ Sangramento

☐ Outro. Especificar:

☐ Não sabe ou não informa

10. Outras coagulopatias associadas

☐ Sim. Especificar:

☐ Não

☐ Não sabe ou não informa

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

☐ Sim. Especificar:

☐ Não

☐ Não sabe ou não informa

12. Foi realizada circuncisão?

☐ Sim Data:

☐ Não (Ir para o item C1)

☐ Não sabe ou não informa

a. Foi utilizada cola de fibrina?

☐ Sim

☐ Não

☐ Não sabe ou não informa

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

C. Histórico familiar

1. História familiar de hemofilia?

☐ Sim. Quem?

☐ Não

☐ Não sabe ou não informa

2. Diagnóstico pré-natal durante a gravidez?

☐ Sim

☐ Não

☐ Não sabe ou não informa

3. Número de irmãos (sexo masculino) do paciente (preencha com “0” se não há ou se não se sabe)

☐ com hemofilia

☐ sem hemofilia

☐ status desconhecido

4. Número de irmãs do paciente (preencha com “0” se não há ou se não se sabe)

☐ portadoras

☐ não portadoras

☐ status desconhecido

5. Membros da família (pais, irmãos, irmãs) com inibidor (atual ou diagnóstico passado)

☐ Sim, número total de

. Quem?

☐ Não

☐ Não sabe ou não informa

D. Tratamento

1. O paciente está recebendo infusões de concentrado de fator ou já recebeu infusões?

☐ Sim, preencha o formulário 4 “Primeiros 75 dias de exposição”

☐ Não

2. Recomendação de tratamento até a próxima consulta

☐ Sob demanda

☐ Profilaxia

☐ Imunotolerância

Se profilaxia:

a. Dose por dia

UI/mg

b. Frequência por semana

vezes por semana

c. Ou outra

d. Dose inicial para sangramento menor*:

UI/mg

e. Dose inicial após sangramento maior**:

UI/mg

f. Dose inicial após trauma grave:

UI/mg

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

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

D. Tratamento (continuação)

g. Nome do produto

Se o nome do produto for diferente, especificar:

h. Tratamento adicional

3. Peso (Kg):

, Kg

4. Observações e heredograma

A. Formulário de atualização

1. Grupo sanguíneo:

☐ A

☐ B

☐ O

☐ AB

2. Mutação conhecida:

☐ Sim

☐ Não

Se sim, intron 22?

☐ Sim

☐ Não. Anexar cópia do diagnóstico molecular.

3. Duração de aleitamento materno exclusivo

semanas

Formulário 3
Dados imunológicos até o 75º dia de exposição

Código do centro:
ID do paciente:

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

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

☐ Sim
☐ Não

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

vezes

3. Durante o período descrito, o paciente desenvolveu:

a. Alergia/Atopia (incluindo asma)

☐ Sim
☐ Não

b. Alergia ao leite de vaca

☐ Sim
☐ Não

c. Outras doenças crônicas (com duração > 3 meses)

☐ Sim Especifique:
☐ Não

4. Histórico de alergia na família

Algun dos pais, irmãos ou irmãs desenvolveu alergia/atopia (incluindo asma) no período descrito?

☐ Sim
☐ Não
☐ Não sabe ou não informa

5. Medicação utilizada no período descrito

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

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

Nome do medicamento

Indicação

Data de início do tratamento

Data do fim do tratamento

☐ Ainda em andamento

Nome do medicamento

Indicação

Data de início do tratamento

Data do fim do tratamento

☐ Ainda em andamento

Nome do medicamento

Indicação

Data de início do tratamento

Data do fim do tratamento

☐ Ainda em andamento

Nome do medicamento

Indicação

Data de início do tratamento

Data do fim do tratamento

☐ Ainda em andamento

6. Vacinações durante o período descrito:

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

Tipo de vacinação		Data da vacinação	
Reações adversas, se relatadas		Modo de vacinação	☐ Subcutâneo ☐ Intramuscular ☐ Desconhecido
Tipo de vacinação		Data da vacinação	
Reações adversas, se relatadas		Modo de vacinação	☐ Subcutâneo ☐ Intramuscular ☐ Desconhecido
Tipo de vacinação		Data da vacinação	
Reações adversas, se relatadas		Modo de vacinação	☐ Subcutâneo ☐ Intramuscular ☐ Desconhecido
Tipo de vacinação		Data da vacinação	
Reações adversas, se relatadas		Modo de vacinação	☐ Subcutâneo ☐ Intramuscular ☐ Desconhecido
Tipo de vacinação		Data da vacinação	
Reações adversas, se relatadas		Modo de vacinação	☐ Subcutâneo ☐ Intramuscular ☐ Desconhecido
Tipo de vacinação		Data da vacinação	
Reações adversas, se relatadas		Modo de vacinação	☐ Subcutâneo ☐ Intramuscular ☐ Desconhecido
Tipo de vacinação		Data da vacinação	
Reações adversas, se relatadas		Modo de vacinação	☐ Subcutâneo ☐ Intramuscular ☐ Desconhecido
Tipo de vacinação		Data da vacinação	
Reações adversas, se relatadas		Modo de vacinação	☐ Subcutâneo ☐ Intramuscular ☐ Desconhecido
Tipo de vacinação		Data da vacinação	
Reações adversas, se relatadas		Modo de vacinação	☐ Subcutâneo ☐ Intramuscular ☐ Desconhecido
Tipo de vacinação		Data da vacinação	
Reações adversas, se relatadas		Modo de vacinação	☐ Subcutâneo ☐ Intramuscular ☐ Desconhecido
Tipo de vacinação		Data da vacinação	
Reações adversas, se relatadas		Modo de vacinação	☐ Subcutâneo ☐ Intramuscular ☐ Desconhecido
Tipo de vacinação		Data da vacinação	
Reações adversas, se relatadas		Modo de vacinação	☐ Subcutâneo ☐ Intramuscular ☐ Desconhecido

7. Total de “dias de risco” neste periodo de acompanhamento

 dias

Formulário 4

Primeiros 75 dias de exposição

Data da visita:

Dia Mês Ano

Código do centro:

ID do paciente:

página 1 de 1

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

* Registrar localização do sangramento

** Sangramento menor: dor fraca, inchaço mínimo, mínima restrição de movimento, controle após 24 horas após o tratamento.

Sangramento maior: dor, efusão, limitação de movimento, falha no controle até 24 horas após o tratamento.

F. Eventos durante o período avaliado

1. Data da consulta:

Dia		Mês		Ano	

Período avaliado

dias

2. Data do último formulário preenchido:

Dia		Mês		Ano	

3. O tratamento prescrito foi realizado?

☐ Sim (Ir para o item 4)

☐ Não, o tratamento foi intensificado em:

Dia		Mês		Ano	

Especificar:

☐ Não, o tratamento foi reduzido em:

Dia		Mês		Ano	

Especificar:

☐ Não, o tratamento foi interrompido em:

Dia		Mês		Ano	

Especificar:

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

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

4. Sangramentos durante o período avaliado?

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

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

Localização	Sangramento Menor <i>Dor leve, inchaço mínimo, mínima restrição de movimento, melhora dentro de 24 horas após o tratamento.</i>			Sangramento Maior <i>Dor, edema, limitação de movimento, falha de resposta em 24 horas de tratamento.</i>			
	Articulação	Direito	Esquerdo	Desconhecido	Direito	Esquerdo	Desconhecido
Ombro							
Cotovelo							
Pulso							
Cintura							
Joelho							
Tornozelo							
Outro							
Outro							
Total de articulações							

Outros locais	Direito	Esquerdo	Desconhecido	Direito	Esquerdo	Desconhecido
Intra-craniano						
Muscular						
Mucosa ou tecidos moles						
Trauma na cabeça						
Outro						
Outro						

6. Uso de fatores de coagulação durante o período avaliado

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

7. Uso de fator de coagulação

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

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

Número exato

ou

Número aproximado

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

9. Cirurgias ou procedimentos invasivos durante o período avaliado

☐ Sim, preencha a tabela abaixo

☐ Não (ir para o item 11)

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

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

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

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

dias ou
☐ Não sabe / Não informa

11. Criança está estudando em:

- ☐ Creche
☐ Pré-escola
☐ Escola normal
☐ Escola especial
☐ Não estuda (ir para o item 14)

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

dias ou
☐ Não sabe / Não informa

13. Necessita de auxílio escolar devido à hemofilia?

- ☐ Sim
☐ Não

14. Foi detectado inibidor no período descrito?

- ☐ Sim
☐ Não (ir para o item G1)
☐ Não sabe / Não informa (ir para o item G1)

15. Inibidor positivo

, UB/mL Primeira dosagem
 Data

, UB/mL Segunda dosagem
 Data

16. Título máximo de inibidor no período avaliado:

, UB/mL
 Data

17. Recuperação verificada?

- ☐ Sim, recuperação normal (se teste de recuperação de fator VIII $\geq$ 66% do valor esperado)
☐ Sim, recuperação diminuída (se teste de recuperação de fator VIII $<$ 66% do valor esperado)
☐ Não

G. Indicação de tratamento para o próximo período

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

- ☐ Sim
☐ Não (ir para o item 3)

2. Tipo de tratamento até a próxima consulta:

- ☐ Demanda
☐ Profilaxia
☐ Terapia de imunotolerância

Se profilaxia:

Dose por dia

UI

Frequência por semana

vezes por semana

Ou outro (especificar)

dose inicial para sangramentos menores

UI/mg

dose inicial para sangramentos maiores

UI/mg

dose inicial para trauma grave

UI/mg

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

Nome do produto

Tratamento adicional

3. Dose domiciliar

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

4. Peso (Kg) no dia da consulta

Kg

5. Participante de outros estudos?

- ☐ Sim
☐ Não

6. Observações

1. Data do final do estudo

2. Motivo para a finalização do estudo

☐ Paciente / Pais / Responsáveis retiraram termo de consentimento

☐ Paciente está em tratamento em outro centro

☐ Falecimento

Data:

Causa da morte

☐ Perda de seguimento durante o estudo

☐ Outro

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

☐ Sim

☐ Não

Formulário 8

Controle de coleta de material biológico

Data da visita:
Dia Mês Ano

Código do centro:

ID do paciente:

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

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

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

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

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

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

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

Formulário 7
Formulário de correção

Código do centro:

ID do paciente:

1. Formulário de correção de dados

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

2. Data da consulta ou de
preenchimento do formulário

3. Questão (Informe letra e número disponibilizado)

4. Valor incorreto submetido:

5. Valor correto a ser considerado:

6. Nome do responsável pela modificação:

7. Data

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

DE: Dias de exposição

OB: Preenchimento obrigatório completo por todos os centros participantes

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

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

HBH: Preenchimento exclusivo do Hemocentro de Belo Horizonte

T0 – Diagnóstico da hemofilia

- ▶ Preenchimento de todos os formulários pertinentes;
- ▶ Coleta de 01 tubo de 5mL contendo EDTA como anticoagulante;
A amostra de EDTA deve ser enviada ao Hemocentro de Belo Horizonte no mesmo dia da coleta, por SEDEX, à temperatura ambiente.
- ▶ Coleta de 01 tubo de 5mL contendo citrato de sódio como anticoagulante;
A amostra coletada em citrato deve ser centrifugada imediatamente a 1.500rpm por 15 minutos. O plasma deve ser aliquotado em dois tubos *ependorfs* (1mL em cada tubo), identificados e congelados a -20° C.

As amostras congeladas devem ser enviadas ao Hemocentro de Belo Horizonte a cada três meses (primeiro dia útil dos meses de junho, outubro e fevereiro, exceto quintas e sextas-feiras). O transporte deverá ser realizado em caixas de isopor, contendo gelo seco.

T1 – Desenvolvimento de inibidores ou 75° dia de exposição sem desenvolvimento de inibidores

- ▶ Preenchimento de todos os formulários pertinentes;
- ▶ Coleta de 01 tubo de 5mL contendo citrato de sódio como anticoagulante;
A amostra coletada em citrato deve ser centrifugada imediatamente a 1.500rpm por 15 minutos. O plasma deve ser aliquotado em dois tubos *ependorfs* (1mL em cada tubo), identificados e congelados a -20° C.

As amostras congeladas devem ser enviadas ao Hemocentro de Belo Horizonte a cada três meses (primeiro dia útil dos meses de junho, outubro e fevereiro, exceto quintas e sextas-feiras). O transporte deverá ser realizado em caixas de isopor, contendo gelo seco.

T2 – Após tratamento de imunotolerância (caso tenha sido realizado)

- ▶ Preenchimento de todos os formulários pertinentes;
- ▶ Coleta de 01 tubo de 5mL contendo citrato de sódio como anticoagulante;
A amostra coletada em citrato deve ser centrifugada imediatamente a 1.500rpm por 15 minutos. O plasma deve ser aliquotado em dois tubos *ependorfs* (1mL em cada tubo), identificados e congelados a -20° C.

As amostras congeladas devem ser enviadas ao Hemocentro de Belo Horizonte a cada três meses (primeiro dia útil dos meses de junho, outubro e fevereiro, exceto quintas e sextas-feiras). O transporte deverá ser realizado em caixas de isopor, contendo gelo seco.

Outros períodos importantes

Coleta para dosagem de inibidores a cada 10 dias de exposição:

- ▶ Alíquotas de 500_μL do plasma coletado devem ser conservadas a -80°C.;
- ▶ As alíquotas devem ser enviadas a cada 60 dias ao Hemocentro de Belo Horizonte.

Convocações periódicas dos pacientes:

- ▶ Os pacientes devem ser convocados a cada 45 dias (± 15 dias) para preenchimento dos formulários pertinentes e acompanhamento da cartilha.

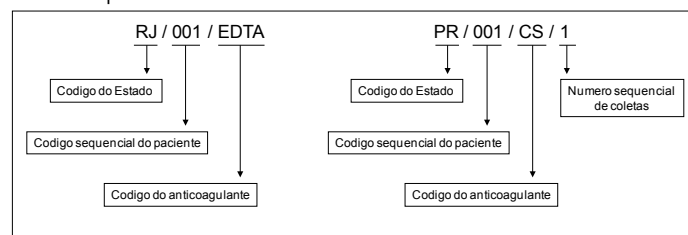
Final do acompanhamento:

- ▶ Após 100 dias de exposição o paciente deve ser convocado para preenchimento dos formulários pertinentes e acompanhamento da cartilha;
- ▶ Coleta de 01 tubo de 5mL contendo citrato de sódio como anticoagulante;
A amostra coletada em citrato deve ser centrifugada imediatamente a 1.500rpm por 15 minutos. O plasma deve ser aliquotado em dois tubos *ependorfs* (1mL em cada tubo), identificados e congelados a -20°C.

As amostras congeladas devem ser enviadas ao Hemocentro de Belo Horizonte a cada três meses (primeiro dia útil dos meses de junho, outubro e fevereiro, exceto quintas e sextas-feiras). O transporte deverá ser realizado em caixas de isopor, contendo gelo seco.

Identificação de amostras:

Exemplo:



NOTA: Atenção ao controle das amostras coletadas. A correspondência entre a identificação e a ordem das coletas é essencial para o andamento do estudo.

Endereço para envio das amostras para o
Hemocentro de Belo Horizonte:

A/C Daniel G. Chaves
Serviço de Pesquisa - Hemocentro de Belo Horizonte
Alameda Ezequiel Dias, 321 / Santa Efigênia
Belo Horizonte - Minas Gerais
CEP: 30.130-110