

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Avaliação de biomarcadores fenotípicos celulares e humorais na Hemofilia A

por

Amanda Cardoso de Oliveira Silveira Cassette

Belo Horizonte
2016

Amanda Cardoso de Oliveira Silveira Cassette

Avaliação de biomarcadores fenotípicos celulares e humorais na Hemofilia A

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Concentração de Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dr. Olindo Assis Martins Filho

Coorientação: Dr. Daniel Gonçalves Chaves

Belo Horizonte
2016

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

C344a 2016	<p>Cassette, Amanda Cardoso de Oliveira Silveira.</p> <p>Avaliação de biomarcadores fenotípicos celulares e humorais na Hemofilia A / Amanda Cardoso de Oliveira Silveira Cassette. – Belo Horizonte, 2016.</p> <p>XVII, 76 f.: il.: 210 x 297 mm.</p> <p>Bibliografia: 72 - 83</p> <p>Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.</p> <p>1. Hemofilia A/imunologia 2. Fator VIII/uso terapêutico 3. Coagulação Sanguínea/imunologia I. Título. Martins Filho, Olindo Assis (Orientação). III. Chaves, Daniel Gonçalves (Coorientação)</p> <p>CDD – 22. ed. – 616.157 2</p>
---------------	--

Avaliação de biomarcadores fenotípicos celulares e humorais na Hemofilia A

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Concentração de Biologia Celular e Molecular.

Banca Examinadora:

Dr. Olindo Assis Martins Filho (CPqRR/FIOCRUZ) **Presidente**

Dr. Daniel Gonçalves Chaves (HEMOMINAS) Titular

Dr. Marco Antônio Silva Campos (CPqRR/FIOCRUZ) Titular

Dra. Érica Alessandra Rocha Alves (CPqRR/FIOCRUZ) Titular

Dra. Suely Meireles Rezende (UFMG) Titular

Dra. Luci Maria Sant'Ana Dusse (UFMG) Titular

Suplente: Dra. Patrícia Aparecida de Assis (CPqRR/FIOCRUZ)

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte: 01/03/2016

COLABORADORES

Centro de Pesquisas René Rachou – Belo Horizonte

Dra. Andréa Teixeira de Carvalho – Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores

Dra. Samantha Ribeiro Béla – Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores

Ms. Marcela de Lima Moreira – Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores

Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte

Dra. Fernanda Freire Campos Nunes – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia

Fundação Hemominas, HEMOMINAS – Belo Horizonte

Dr. Márcio Antônio Portugal Santana – Ambulatório da Fundação Hemominas

Jerusa Manhães Freitas – Laboratório de Hematologia da Fundação Hemominas

Isabella Gomes Ribeiro – Serviço de Pesquisa da Fundação Hemominas

Hayama Cristina Braga Araújo – Serviço de Pesquisa da Fundação Hemominas

Mariana Ruckert – Serviço de Pesquisa da Fundação Hemominas

Julia Marques Nascimento – Serviço de Pesquisa da Fundação Hemominas

SUPORTE FINANCEIRO:

CPqRR/FIOCRUZ: Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz

FAPEMIG: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

HEMOMINAS: Fundação Hemominas

“Descobri também que poder comer, beber e ser recompensado pelo seu trabalho, é um presente de Deus.” (Ec 3.13)

Dedico este trabalho ao meu bem mais precioso, minha FAMÍLIA:
meus pais, *José e Vânia*
meus irmãos e minha cunhada, *Luiz, Débora e Amanda*
e meu esposo, *Sérgio*.

Agradecimentos

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho pela oportunidade de fazer parte de um grupo de pesquisa, pela orientação e por conviver com um profissional competente e dedicado. Obrigada por todos os direcionamentos e aprendizados que foram essenciais para este trabalho e para minha formação.

Ao Dr. Daniel Gonçalves Chaves pela orientação deste trabalho e por sempre ir além do seu papel de coorientador. Obrigada pela confiança, ensinamentos e por estar sempre disposto a contribuir para o meu crescimento profissional e pessoal. Além disso, muito obrigada pela amizade e convivência tão especial.

Aos colaboradores, Dra. Andréa Teixeira de Carvalho, Dra. Samantha Ribeiro Béla, Ms. Marcela de Lima Moreira, Dra. Fernanda Freire Campos Nunes, Dr. Márcio Antônio Portugal Santana e Jerusa Manhães Freitas que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

A todas as alunas de iniciação científica que contribuíram de alguma forma para este projeto, Isabella Gomes Ribeiro, Hayama C. B. Araújo, Mariana Ruckert e Julia Marques Nascimento.

Ao corpo técnico do GIPB, do Serviço de Pesquisa da Fundação Hemominas e da Plataforma de Citometria de Fluxo da Fiocruz.

À Maisa Santos e Jucélia Amorim pelo exemplo de profissionalismo, carinho e amizade em todos esses anos.

Aos funcionários e aos pacientes da Fundação Hemominas que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À Biblioteca do CPqRR por prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

À Fundação Oswaldo Cruz, ao Centro de Pesquisas René Rachou e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade ofertada.

Aos órgãos financiadores, fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos que fizeram parte da minha vida durante esses oito anos de LBDM e GIPB, seria injustiça citar apenas alguns nomes neste momento, pois foram tantas pessoas que fizeram parte dos meus relacionamentos neste período que só tenho a agradecer a TODOS que fizeram e que fazem parte deste grupo tão importante e especial. Contudo, não posso deixar de citar as minhas queridas “Divas Quase Doutoradas”, meninas a pós-graduação ao lado de vocês se torna um desafio possível, muito obrigada por todos os momentos especiais que vivemos juntas, a presença e os conselhos de vocês foram fundamentais para conclusão desta etapa.

Aos “Hemoamigos” agradeço pela disponibilidade, amizade, convivência agradável, momentos de descontração e auxílio nos experimentos, vocês são pessoas muito especiais.

Aos colegas de outros laboratórios e da pós-graduação pela convivência no dia-a-dia das disciplinas e pelos desabafos nos corredores do CPqRR.

Aos meus queridos amigos e aos irmãos da IPF, presentes de Deus na minha vida, meu agradecimento especial e reconhecimento por tudo que vocês representam para mim.

A todos os meus familiares, por sempre torcerem e orarem por mim.

Aos meus pais José e Vânia, meus irmãos Luiz e Débora e minha cunhada Amanda por sempre estarem presentes nos momentos mais importantes da minha vida. Agradeço a vocês por acreditarem em mim, pelo exemplo de vida e por todo amor e dedicação que me impulsionam a cada dia. Vocês são parte essencial da minha vida.

Ao Sérgio, por ser um servo fiel, companheiro diário e por sempre me dar força para prosseguir. Nossa família é um presente de Deus em minha vida.

Sobretudo, agradeço Aquele, sem o qual, nada do que está feito se fez, ao meu fiel Deus, primordial nessa etapa tão significativa e transformadora da minha vida.

A todos vocês meus sinceros agradecimentos.

Resumo

A hemofilia A (HA) congênita é um distúrbio hemorrágico com transmissão hereditária ligado a deficiência do fator VIII (FVIII). O tratamento da HA é baseado na reposição do FVIII, requerendo infusões intravenosas de concentrados de FVIII exógeno. Durante o tratamento, alguns pacientes desenvolvem uma resposta imune que produz anticorpos anti-FVIII (inibidores). Os inibidores neutralizam a atividade procoagulante do FVIII e diminuem a eficiência do tratamento. Apesar da relevância dos inibidores, os mecanismos imunológicos associados aos inibidores ainda não foram completamente elucidados. Neste trabalho analisou-se o perfil de citocinas intracitoplasmáticas de células do sistema imune inato e adaptativo de pacientes com HA e inibidores [HA α -FVIII(+)] e com HA sem inibidores [HA α -FVIII(-)]. Os resultados mostraram uma menor frequência de monócitos e neutrófilos TNF- α , monócitos IL-5 e neutrófilos IL-4 e uma maior frequência de neutrófilos e linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e T CD19⁺ IL-10 em pacientes do grupo HA α -FVIII(+). Em pacientes do grupo HA α -FVIII(-) observou-se uma maior frequência de monócitos TNF- α e linfócitos B IL-4 e uma menor frequência de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ IL-10. Observou-se o predomínio de um padrão anti-inflamatório/regulador no grupo HA α -FVIII(+) e um padrão pró-inflamatório no grupo HA α -FVIII(-), sugerindo que o microambiente celular pode ser um elemento importante associado à capacidade de desenvolvimento de inibidores. Analisou-se também a presença de micropartículas plasmáticas (MPs) em pacientes com HA. Os resultados mostraram uma maior frequência de MPs derivadas de células endoteliais, granulócitos e linfócitos T em pacientes do grupo HA α -FVIII(-) e uma maior frequência de MPs derivadas de hemácias em pacientes do grupo HA α -FVIII(+). O predomínio de MPs no grupo HA α -FVIII(-) pode ser relacionado ao aumento da ativação celular e influência do microambiente pró-inflamatório. MPs derivadas de hemácias induziram a investigação da presença de anticorpos em hemácias de pacientes com HA. Os resultados demonstraram que pacientes do grupo HA α -FVIII(+) têm uma maior frequência de anticorpos na superfície de hemácias. Em função deste resultado, investigou-se a presença de anticorpos anti-FVIII em concentrados de hemácias de pacientes do grupo HA α -FVIII(+). Foi possível detectar anticorpos anti-FVIII em concentrados de hemácias, sugerindo que essas células podem interagir com anticorpos anti-FVIII. Determinou-se ainda, a avidéz de anticorpos anti-FVIII de pacientes do grupo HA α -FVIII(+). Os resultados demonstraram avidéz superior de anticorpos IgG total e IgG1 anti-FVIII quando comparados a IgG4. Foi observada também uma correlação negativa entre os índices de avidéz de anticorpos IgG4 anti-FVIII de pacientes graves aos títulos de Bethesda, sugerindo que existem variações na avidéz dos anticorpos anti-FVIII dependendo do perfil dos pacientes com HA. No contexto da avaliação da resposta imune contra o FVIII, foi possível identificar biomarcadores fenotípicos celulares e humorais característicos de pacientes com e sem inibidores que podem contribuir para o monitoramento do desenvolvimento e manutenção de anticorpos inibidores do FVIII.

Palavras-chave: Hemofilia A, Fator VIII, Coagulação Sanguínea.

Abstract

Congenital hemophilia A (HA) is a bleeding disorder with hereditary transmission associated to deficiency of factor VIII (FVIII). The treatment of HA is based on replacement of FVIII, requiring exogenous FVIII intravenous infusions. During the treatment some patients develop an immune response that produces anti-FVIII antibodies (inhibitors). Inhibitors neutralize the procoagulant activity of FVIII and affect the treatment efficiency. Despite the relevance of inhibitors, the immunological mechanisms associated to inhibitors are still unknown. In this work, the intracytoplasmic cytokine pattern of innate and adaptive cells from patients with HA and inhibitors [HA α -FVIII(+)] and with HA and without inhibitors [HA α -FVIII(-)] was analyzed. Results showed a lower frequency of TNF- α ⁺ monocytes and neutrophils, IL-5⁺ monocytes and IL-4⁺ neutrophils and an increased frequency of IL-10⁺ neutrophils, lymphocytes T CD4⁺, T CD8⁺ and T CD19⁺ in HA α -FVIII(+) group. In HA α -FVIII(-) group was observed an increased frequency of TNF- α ⁺ monocytes and IL-4⁺ lymphocytes B and a lower frequency of IL-10⁺ lymphocytes T CD4⁺ and T CD8⁺. A predominance of an anti-inflammatory/regulatory pattern in HA α -FVIII(+) patients and a mixed pattern, with a bias toward inflammatory cytokine profile, in HA α -FVIII(-) patients was observed. The occurrence of these profiles seems to be associated to the capacity of inhibitors development. The presence of plasmatic microparticles (MPs) in HA patients was also analyzed. The results showed increased levels of circulating MPs derived from endothelial cells, granulocytes, and T lymphocytes in patients without FVIII inhibitors and MPs from erythrocytes were higher in patients with inhibitors. The predominance of MPs in HA α -FVIII(-) patients probably was provided by the increased of cellular activation due to an inflammatory microenvironment. MPs from erythrocytes induced to the investigation of the presence of antibodies in the surface of erythrocytes of HA patients. The results demonstrated that HA α -FVIII(+) patients have a higher frequency of antibodies in the surface of erythrocytes. Due to this result, the presence of anti-FVIII antibodies in erythrocytes concentrates in HA α -FVIII(+) patients was investigated. It was possible to detect anti-FVIII antibodies in erythrocytes concentrates, suggesting that FVIII can interact with anti-FVIII antibodies. The avidity of anti-FVIII antibodies in HA α -FVIII(+) patients was also determined. Results demonstrated a high avidity of anti-FVIII total IgG and IgG1 antibodies when compared to IgG4. A negative correlation between the avidity of anti-FVIII IgG4 antibodies in severe patients and Bethesda titer was observed, suggesting that there are variations in the avidity of anti-FVIII antibodies depending on the profile of HA patients. In the context of the evaluation of the immune response directed to FVIII, it was possible to identify phenotypic cellular and humoral biomarkers profiles of patients with and without inhibitors, thereby contributing to tracking the development and maintenance of FVIII inhibitors antibodies.

Key-words: Hemophilia A, Factor VIII, Blood coagulation.

Lista de Figuras

Figura	Página
Figura 1. Modelo da cascata de coagulação sanguínea.....	20
Figura 2. Modelo celular da cascata de coagulação sanguínea.....	21
Figura 3. Domínios e sítios de glicosilação da molécula de FVIII.....	22
Figura 4. Estratégia de análise para identificação de micropartículas plasmáticas por citometria de fluxo	41
Figura 5. Perfil de análise das hemácias por citometria de fluxo	42
Figura 6. Análises do perfil de citocinas intracitoplasmáticas de monócitos e neutrófilos	47
Figura 7. Análises do perfil de citocinas intracitoplasmáticas de linfócitos T	48
Figura 8. Análises do perfil de citocinas intracitoplasmáticas de linfócitos B	49
Figura 9. Determinação de micropartículas derivadas de células endoteliais, leucócitos, hemácias e plaquetas.....	50
Figura 10. Determinação de micropartículas derivadas de granulócitos, monócitos e linfócitos T	51
Figura 11. Representação gráfica do perfil de hemácias e do percentual de anticorpos do tipo IgG em hemácias. Determinação de anticorpos do tipo IgG e IgG anti-FVIII em hemácias...	52
Figura 12. Determinação de micropartículas derivadas de células endoteliais, hemácias, granulócitos e linfócitos T	54
Figura 13. Densidade óptica das amostras não tratadas e tratadas com ureia	56
Figura 14. Índice de Aidez em percentual de anticorpos IgG total e das subclasses IgG1 e IgG4	57
Figura 15. Correlações entre o IA (%) de IgG4 anti-FVIII e títulos de Bethesda (UB/mL)	58

Lista de Tabelas

Tabela	Página
Tabela 1. Características dos pacientes do teste de Elisa-Avidez.....	55.

Lista de Siglas e Abreviaturas

APC	<i>Allophycocyanin</i> - Aloficocianina
APCs	Células apresentadoras de antígenos
BD	Grupo controle de indivíduos doadores de sangue
CCP	Concentrado de complexo protrombínico
CD	<i>Cluster of differentiation</i> - Cluster de diferenciação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dpFVIII	Fator VIII derivado de plasma humano
DO	Densidade óptica
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> - Ensaio de imunoabsorção enzimática
FII	Fator II da coagulação sanguínea (trombina)
FH	Fundação Hemominas
FIX	Fator IX da coagulação sanguínea
FSC	<i>Forward SCatter</i> - Tamanho
FV	Fator V da coagulação sanguínea
FVII	Fator VII da coagulação sanguínea
FVIII	Fator VIII da coagulação sanguínea
FvW	Fator de von Willebrand
FX	Fator X da coagulação sanguínea
FXI	Fator XI da coagulação sanguínea
FXII	Fator XII da coagulação sanguínea
FXIII	Fator XIII da coagulação sanguínea
HA	Hemofilia A
HA α -FVIII(-)	Pacientes com hemofilia A sem inibidores contra FVIII
HA α -FVIII(+)	Pacientes com hemofilia A com inibidores contra FVIII
HB	Hemofilia B
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
IA	Índice de avides
IFN- γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G subclasse 1

IgG2		Imunoglobulina G subclasse 2
IgG4		Imunoglobulina G subclasse 4
IL-1□□□	□	Interleucina 1 beta
IL-2		Interleucina 2
IL-4		Interleucina 4
IL-5		Interleucina 5
IL-10		Interleucina 10
ITI		Indução da imunotolerância
MPs		Micropartículas plasmáticas circulantes
OPD		Orto-fenilenodiamina
PBS		Tampão fosfato salina
PE		<i>Phycoerythrin</i> - Ficoeritrina
PECy5		<i>Phycoerythrin Cyanin-5</i> - Ficoeritrina cianina-5
PERCP		<i>Peridinin-chlorophyll</i> - Peridinina clorofila
PERCP-Cy5.5		<i>Peridinin-chlorophyll Cyanin-5.5</i> - Peridinina clorofila cianina-5.5
PLP		Plasma livre de plaquetas
PS		Fosfatidilserina
rFVIIa		Fator VII recombinante ativado
rFVIII		Fator VIII recombinante
RNA		Ácido ribonucleico
SSC		<i>Side Scatter</i> - Granulosidade
TA		Temperatura ambiente
TC		<i>TriColor</i> - Tri-Color
TF		Fator tissular
TNF-□□□	□	Fator de necrose tumoral alfa
Tregs		Células T reguladoras
U		Ureia
UB		Unidade de Bethesda
UI		Unidade Internacional
WFH		<i>World Federation of Hemophilia</i> - Federação Mundial de Hemofilia

Sumário

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Hemostasia	19
1.2 Fator VIII	22
1.3 Hemofilia A.....	23
1.4 Tratamento da Hemofilia A	24
1.5 Resposta Imune ao FVIII na Hemofilia A	26
1.6 Anticorpos inibidores do FVIII.....	27
1.7 Alternativas terapêuticas à presença dos inibidores do FVIII.....	29
1.8 Micropartículas plasmáticas circulantes	30
2 JUSTIFICATIVA	32
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral.....	35
3.2 Objetivos específicos	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Participantes da pesquisa e coleta de amostras	37
4.2 Imunofenotipagem de leucócitos e produção de citocinas intracelulares	38
4.2.1 Descrição das amostras	38
4.2.2 Imunofenotipagem de leucócitos e produção de citocinas intracelulares	38
4.3 Análise do perfil de micropartículas plasmáticas (MPs).....	39
4.3.1 Descrição das amostras	39
4.3.2 Análise do perfil de micropartículas plasmáticas (MPs).....	40
4.4 Verificação de anticorpos em hemácias	41
4.4.1 Descrição das amostras	41
4.4.2 Verificação de anticorpos em hemácias	42
4.5 Determinação dos índices de avidéz de anticorpos anti-FVIII	43

4.5.1 Descrição das amostras	43
4.5.2 Determinação dos índices de avidéz de anticorpos anti-FVIII	43
4.6 Análises estatísticas.....	44
5 RESULTADOS	45
5.1 Imunofenotipagem de leucócitos e produção de citocinas intracelulares	46
5.1.1 Imunidade Inata (monócitos e neutrófilos).....	46
5.1.2 Imunidade Adaptativa (células T CD4+ e T CD8+ e linfócitos B).....	48
5.2 Análise do perfil de micropartículas plasmáticas (MPs).....	49
5.3 Verificação de anticorpos em hemácias	51
5.4 Determinação dos índices de avidéz de anticorpos anti-FVIII	55
6 DISCUSSÃO.....	59
7 CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS.....	72
ANEXO DO ARTIGO PUBLICADO.....	84

1.1 Hemostasia

O sangue é responsável por inúmeras funções no organismo vivo. Entretanto, para manutenção dessas funções, o sangue precisa permanecer fluido dentro dos vasos sanguíneos. Caso ocorra o extravasamento do sangue dos vasos, surgem algumas reações que auxiliam na interrupção do sangramento. O conjunto dessas reações é conhecido como coagulação sanguínea, um processo vital para a manutenção da hemostasia dos seres humanos quando ocorre algum tipo de lesão em tecidos e/ou órgãos.

Na década de 1960, Macfarlane e Davie & Ratnoof propuseram pela primeira vez a teoria de uma “cascata de coagulação” para representação da fisiologia da coagulação do sangue. Nesse modelo, a coagulação ocorre devido à ativação proteolítica sequencial de pró-enzimas por proteases plasmáticas, resultando na formação de trombina que, por sua vez, converte o fibrinogênio em fibrina. O processo de coagulação descrito é realizado pela interação de duas vias, “via intrínseca” e “via extrínseca” da coagulação (MACFARLANE, 1964; DAVIE & RATNOFF, 1964).

A ativação do fator XII (FXII) na via intrínseca ocorre quando o sangue entra em contato com superfícies de cargas elétricas negativas (superfícies com colágeno exposto) e requer a presença da pré-calicreína (serino-protease) e do cininogênio (cofator não enzimático). O FXII ativado ativará o fator XI (FXI), que por sua vez ativará o fator IX (FIX). O FIX ativado, na presença do fator VIII (FVIII), ativa o fator X (FX) (“via comum”) (BROZE, 1995).

A via extrínseca é iniciada pelo trauma com a ativação do fator VII (FVII), que ativará diretamente o FX. A “via comum” ou “via de ativação do FX” promove a ativação do fator V (FV), possibilitando a formação do complexo protrombinase, que leva a conversão da protrombina (fator II ou FII) em trombina (FII ativado), que promove a transformação do fibrinogênio em fibrina, que se interligará para formar o coágulo de fibrina. O coágulo ativará o fator XIII (FXIII) que promove a estabilização do mesmo (Figura 1) (BROZE, 1995).

Atualmente, esse modelo da cascata de coagulação sanguínea não é considerado adequado fisiologicamente, tendo em vista que a separação e a independência entre as vias de ativação não ocorre em seres humanos, como podemos observar na hemofilia A.

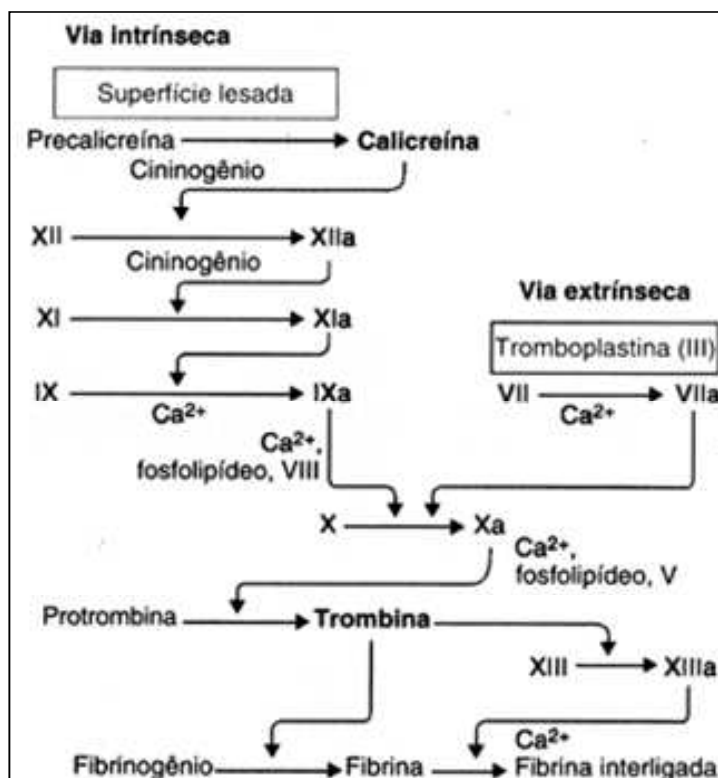


Figura 1: Modelo da cascata de coagulação sanguínea (www.geocities.com/bioquimicaplicada/Coagul6.gif, adaptado).

Na década de 2000, foi proposto um novo modelo de coagulação sanguínea por Hoffman (2001, 2003). O denominado “modelo celular” demonstra que as vias intrínseca e extrínseca da coagulação não atuam de forma independente e sim de maneira complementar. O modelo destaca a interação entre os fatores de coagulação e as superfícies celulares e é baseado em três etapas: iniciação, amplificação e propagação.

A etapa de iniciação da coagulação ocorre no local da exposição sanguínea, mediada por células extravasculares que expressam fator tissular (TF) (fibroblastos, células mononucleares, macrófagos e células endoteliais). Na superfície dessas células o TF se liga ao FVIIa, e ativa os fatores IX e X. O FX ativado, por sua vez, se associa ao fator Va formando o complexo de protrombinase na superfície celular. Em contrapartida, o FIX ativado se liga à superfície de plaquetas. Nessa fase inicial ocorre a conversão de pequenas quantidades de protrombina em trombina. Durante a etapa de amplificação, a pequena quantidade de trombina gerada provoca ativação de plaquetas, que expõem seus receptores e sítios de ligação a fatores de coagulação ativados. Há ainda a ativação dos fatores V, VIII e XI em suas superfícies. Nessa etapa, o complexo FVIII/FvW (fator de von Willebrand) dissocia-se,

gerando maior adesão e agregação de plaquetas. E por fim, na etapa de propagação, diversos eventos ocorrem na superfície das plaquetas ativadas como: ligação do FIX ativado ao FVIII ativado, dissociação do FX ativado antes ligado ao FV ativado e a formação do complexo tenase (FVIIIa/FIXa/FXa). Nesse momento ocorre uma formação significativa de trombina, a qual por sua vez leva à clivagem do fibrinogênio à fibrina, possibilitando a formação do coágulo de fibrina (Figura 2) (HOFFMAN & MONROE, 2001; HOFFMAN, 2003).

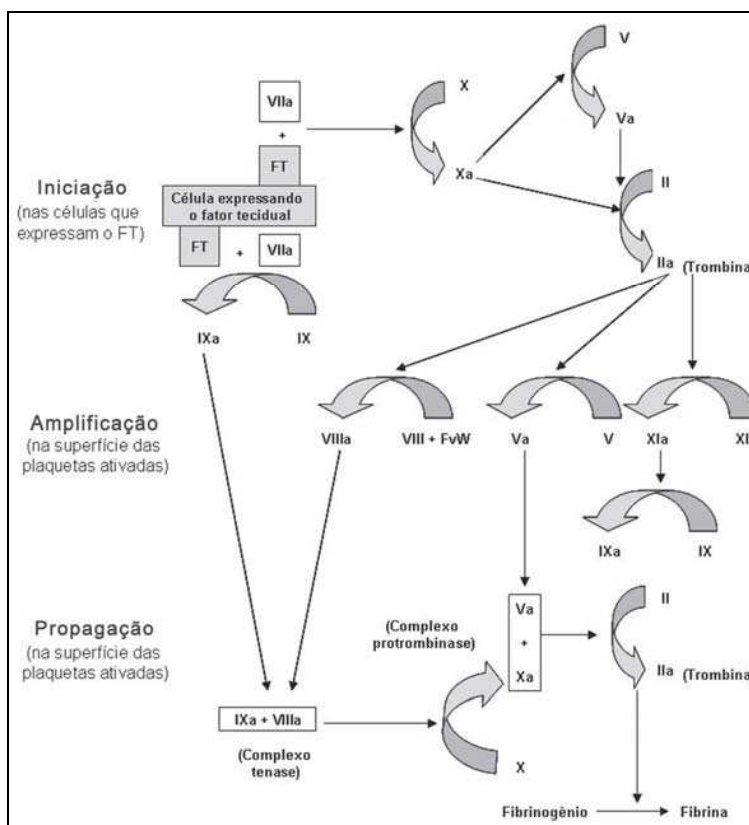


Figura 2: Modelo celular da cascata de coagulação sanguínea (Traduzido e adaptado por FERREIRA *et al.*, 2010).

Considerando o modelo celular da cascata de coagulação sanguínea é possível dimensionar a relevância dos fatores da coagulação e ainda mensurar as possíveis alterações acarretadas pela deficiência de um desses componentes.

1.2 Fator VIII

O FVIII é codificado pelo gene conhecido como *F8* com cerca de 180 Kb e 26 exons, presente na extremidade distal do braço longo do cromossomo X, porção Xq28, cuja expressão ocorre principalmente nos hepatócitos e nas células endoteliais sinusoidais do fígado.

O transcrito do FVIII é de aproximadamente 9 Kb com 7.053 nucleotídeos, traduzido como um precursor proteico de 2.351 aminoácidos, com cerca de 330 kDa (GITSCHIER *et al.*, 1984; WOOD *et al.*, 1984; TOOLE *et al.*, 1984; LEVINSON *et al.*, 1992). A glicoproteína madura do FVIII contém 2.332 aminoácidos e seu peso molecular estimado é de 265 kDa, sendo altamente glicosilada, com 25 sítios possíveis de asparagina para formar N-glicosilação (VEHAR *et al.*, 1984; LENTING *et al.*, 1998).

Na sua forma nativa, o FVIII é constituído de diferentes domínios com homologia interna (NH₂-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH), sendo os três primeiros domínios da porção N-terminal, A1, A2 e A3, que apresentam homologia na sequência de aminoácidos de aproximadamente 30%. Os domínios A2 e A3 são separados pelo domínio B e a porção C-terminal da proteína madura tem dois domínios homólogos: C1 e C2 (Figura 3) (KANE & DAVIE, 1986; LENTING *et al.*, 1998; WALTER *et al.*, 2013).

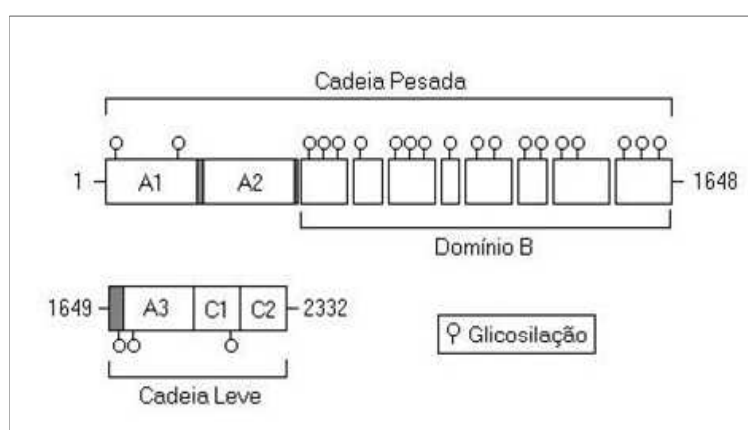


Figura 3: Domínios e sítios de glicosilação da molécula de FVIII (BOVENSCHEN *et al.*, 2005, modificado).

O FVIII circula no plasma associado ao FvW via domínio C2, interagindo na forma de um heterodímero, constituído de uma cadeia pesada (domínios A1-A2 e B) e de uma cadeia

leve (domínios A3-C1-C2), que são associadas via ligações não-covalentes. A formação do complexo FVIII-FvW evita a interação entre o FVIII e os outros componentes da cascata de coagulação sanguínea, sendo necessário que o heterodímero sofra uma ativação proteolítica pela trombina para produzir a forma de cofator ativo, FVIIIa. A trombina ativa o FVIII através da clivagem proteolítica em resíduos de arginina entre os domínios A1 e A2, A2 e B e B e A3, resultando no heterodímero ativado. Após a ativação, o FVIII é liberado do FvW e se liga ao FIX ativado e aos fosfolípidios de membrana para formar o complexo ativador do FX (FAY *et al.*, 1991; LOLLAR *et al.*, 1985; LENTING *et al.*, 1998).

Logo, o FVIII possui um papel fundamental na propagação da cascata de eventos proteolíticos da coagulação sanguínea, que ocorre como parte da resposta à perda de integridade do sistema vascular. A atuação diminuída do FVIII endógeno na cascata de coagulação dificulta a geração de trombina, altera a formação e estabilidade do coágulo de fibrina e conseqüentemente não repara o endotélio vascular adequadamente (ANTONARAKIS *et al.*, 1995; HOYER, 1994).

1.3 Hemofilia A

A hemofilia é descrita como uma tendência de sangramento familiar desde o século V e é a doença hemorrágica ligada ao cromossomo X mais comum em todo o mundo (ROSNER, 1969).

Desde 1937 sabe-se que a hemofilia ocorre devido à deficiência de um componente plasmático. Patek & Taylor demonstraram que um paciente com essa doença hemorrágica tinha uma melhora significativa quando era tratado com o plasma de um indivíduo saudável (PATEK & TAYLOR, 1937). Posteriormente, a hemofilia foi caracterizada pela deficiência ou defeito de diferentes componentes plasmáticos da cascata de coagulação sanguínea, sendo a deficiência de FVIII característica da hemofilia A (HA) e a deficiência de FIX característica da hemofilia B (HB). A HA congênita é uma doença monogênica, crônica e degenerativa, com transmissão hereditária de padrão recessivo ligada ao cromossomo X, que afeta majoritariamente indivíduos do sexo masculino.

As anormalidades genéticas associadas à HA incluem deleções, inversões e mutações no gene do FVIII que podem culminar com a alteração da transcrição, do processamento do RNA ou da tradução do FVIII. A gravidade da HA pode estar relacionada ao tipo de mutação ocorrida no gene *F8*, sendo que aproximadamente 45% dos pacientes com a forma grave da HA apresentam inversão do *intron 22* (GOODEVE & PEAKE, 2003).

A prevalência de pacientes com HA varia de 0,5-2,0 em 10.000 meninos nascidos vivos em todos os grupos étnicos. A prevalência global é de 143.523 pacientes e a prevalência nacional é de 9.616 pacientes. O Brasil é considerado o terceiro país no mundo com o maior número de pacientes com HA e somente no Estado de Minas Gerais já foram registrados cerca de 850 pacientes (WFH, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

O diagnóstico e a classificação da gravidade da HA são baseados na atividade do FVIII residual presente no plasma dos pacientes. A HA é classificada como grave quando a atividade do FVIII for inferior a 1% ($<0,01$ UI/mL) do normal, moderada quando a atividade do FVIII for entre 1-5% (0,01-0,05 UI/mL) do normal e leve quando a atividade do FVIII for superior a 5% e inferior a 40% ($>0,05$ - $<0,40$ UI/mL) do normal. De maneira geral, a HA grave pode acarretar hemorragias espontâneas nas articulações, músculos e órgãos internos e acometer aproximadamente 50% dos pacientes. A HA moderada pode acarretar hemorragias após traumas e acometer aproximadamente 10% dos pacientes. A HA leve pode acarretar hemorragias após traumas significativos ou cirurgias e acometer aproximadamente 30-40% dos pacientes. Uma limitação para essa classificação da gravidade da HA é a incapacidade para se explicar a heterogeneidade clínica apresentada por alguns pacientes durante os episódios hemorrágicos. Em função disso, a gravidade da HA pode também ser baseada na gradação dos sintomas clínicos exibidos pelos pacientes (ALEDORT *et al.*, 1994; ANTONARAKIS, 1995; WHITE *et al.*, 2001; LUCK *et al.*, 2004; BLANCHETTE *et al.*, 2014).

1.4 Tratamento da Hemofilia A

O tratamento adequado dos pacientes com HA visa reduzir a morbidade e a mortalidade associadas às hemorragias frequentes e é baseado na reposição do FVIII deficiente, requerendo assim, infusões intravenosas de concentrados do FVIII. Esse FVIII pode ser purificado do plasma humano (dpFVIII) ou recombinante (rFVIII). O uso de crioprecipitado (FVIII/FvW, fibrinogênio, FXIII e fibronectina) e concentrados de dpFVIII eram as únicas alternativas terapêuticas para pacientes com HA até o início da década de 1990, quando os produtos recombinantes foram introduzidos no mercado mundial. Entretanto, durante esse período o crioprecipitado e os concentrados de FVIII não passavam pelo processo de inativação viral, o que resultou na infecção viral de muitos pacientes,

principalmente pelos vírus HIV e HCV (DIETRICH *et al.*, 1990; KRONER *et al.*, 1994; ANTONARAKIS *et al.*, 1995; EVATT *et al.*, 1999).

A reposição com FVIII restaura a hemostasia alterada dos pacientes. As concentrações e o número de doses do FVIII a ser infundido variam de acordo com o quadro clínico apresentado pelo paciente e com o seu peso corporal (ANTONARAKIS *et al.*, 1995; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Atualmente, as modalidades de tratamentos disponíveis para HA são classificadas em função da gravidade da HA e dos eventos hemorrágicos. O tratamento denominado como sob demanda é baseado em infusões de FVIII para tratar episódios de hemorragias, após sua ocorrência. O tratamento denominado como profilático é baseado em infusões regulares de FVIII, com o objetivo de prevenir a ocorrência de hemorragias. A terapia de reposição de FVIII pode ser realizada em hospitais, ambulatórios ou até mesmo nos domicílios dos pacientes devidamente treinados ou auxiliados por pessoas capacitadas (BERNTORP *et al.*, 2003; TRAORE *et al.*, 2014).

O tratamento sob demanda é caracterizado por infusões de FVIII durante sinais clínicos evidentes de hemorragia, sendo a concentração das doses de FVIII e o número de infusões definidos em função da sintomatologia dos pacientes e gravidade das hemorragias. A profilaxia, por sua vez, é caracterizada pela reposição de FVIII regular e contínua (por no mínimo 45 semanas no ano), sendo recomendada para pacientes com hemofilia A grave. Pode ser classificada como profilaxia primária quando iniciada na ausência de doença articular, após a ocorrência da primeira hemartrose (sangramento intra-articular) de grande articulação e antes dos 3 anos de idade, devendo ser mantida pelo menos até os 18 anos de idade; profilaxia secundária que é iniciada após duas ou mais hemartroses de grande articulação e antes de doença articular e profilaxia terciária que é iniciada após o estabelecimento da doença articular. Os protocolos de profilaxia visam prevenir as hemorragias e suas consequências (FISCHER *et al.*, 2013; BLANCHETTE *et al.*, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

O tratamento da HA está associado a custos elevados, principalmente considerando o tratamento profilático que requer elevadas doses do FVIII infundido. Embora o tratamento tenha se intensificado nos últimos anos em muitos países, ainda é considerável a diferença na frequência e na concentração do FVIII utilizado, tanto em virtude de variações econômicas, quanto em função da ausência de padronização das doses do FVIII para os protocolos de profilaxia e tratamento sob demanda (FISCHER *et al.*, 2001).

A partir dos dados colhidos nos 72 países acompanhados pela Federação Mundial de Hemofilia (WFH) foi possível verificar que o consumo global de concentrados de FVIII foi de

5.233.797.123 UI no ano de 2014. A média de consumo *per capita* global foi de 2,25 UI, variando entre países considerados de renda alta (4,91 UI), de renda média alta (1,40 UI), de renda média baixa (0,24 UI) e de renda baixa (0,013 UI). Com relação ao tipo de concentrado de FVIII consumido globalmente, 43% foram de dpFVIII e 57% de rFVIII (WFH, 2015).

No Brasil a aquisição de concentrados de FVIII para o tratamento dos pacientes com HA é custeada totalmente pelo Ministério da Saúde. O consumo nacional de concentrados de FVIII foi de 585.625.000 UI em 2014 (11,2% do consumo global) e a média de consumo *per capita* foi de 2,89 UI. Com relação ao tipo de concentrado de FVIII consumido, 50% foram de dpFVIII e 50% de rFVIII. Segundo a classificação de renda utilizada pela WFH, o Brasil é considerado como um país de renda média alta, mas o consumo médio nacional é superior ao de países com renda equivalente e se aproxima da meta definida pela Organização Mundial de Saúde de 3,00 UI *per capita* (WFH, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

1.5 Resposta Imune ao FVIII na Hemofilia A

O sistema imune normalmente desenvolve tolerância a antígenos “próprios” durante a fase neonatal e a primeira infância. Porém, pacientes com HA apresentam níveis indetectáveis ou não funcionais de FVIII circulante. Em função disso, o reconhecimento do FVIII como “próprio” e o desenvolvimento da tolerância imunológica não ocorre adequadamente em muitos pacientes com HA e durante o tratamento alguns desses pacientes acabam por desenvolver anticorpos anti-FVIII (inibidores) (LUSHER *et al.*, 1993).

A resposta do sistema imune à terapia de reposição de FVIII está associada ao desenvolvimento de uma resposta imune clássica, na qual o FVIII é endocitado por células apresentadoras de antígenos (APCs), como células dendríticas (principalmente em pacientes que nunca receberam o FVIII), macrófagos e linfócitos B (em pacientes que já receberam o FVIII), que estão presentes em órgãos linfoides secundários (linfonodos e baço). As APCs são, por sua vez, ativadas em função da sinalização específica contra antígenos exógenos, principalmente via receptores de manose, dando início ao processamento intracelular nos endossomos. Após o processamento, pequenos peptídeos (8-12 aminoácidos) gerados são apresentados via moléculas de HLA de classe II na superfície das células T, sendo que essas interações celulares são fundamentais para que a resposta imune contra o FVIII possa ocorrer (RICK *et al.*, 2003; DASGUPTA *et al.*, 2007; ASTERMARK *et al.*, 2013; ASTERMARK *et al.*, 2015).

Durante a estimulação do sistema imune contra o FVIII, a ativação de células T do tipo 1 induzem a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como interferon-gama (IFN- γ), interleucina-2 (IL-2) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que facilitam o estabelecimento de uma resposta imune que favorece a ativação das APCs e estimula células B a se diferenciarem em células produtoras de anticorpos que se ligam ao complemento, como IgG1 e IgG2 e ainda células B de memória (MURPHY, 1998). As células T do tipo 2, por sua vez, produzem citocinas anti-inflamatórias/reguladoras, como interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10), que reduzem a intensidade da resposta imune através da regulação da ativação das APCs e das células do tipo 1, além de estimularem células B a se diferenciarem em células produtoras de anticorpos que não se ligam ao complemento, como IgG4 e ainda células B de memória. Os inibidores do FVIII são anticorpos de alta afinidade, prioritariamente da subclasse IgG4. Entretanto, as subclasses IgG1 e IgG2 estão usualmente presentes (SEDER & PAUL, 1994; REDING *et al.*, 2002; REDING *et al.*, 2003; LOLLAR, 2004; HU *et al.*, 2007; CHAVES *et al.*, 2010). Segundo Pordes e colaboradores (2011) pode haver ainda uma resposta imune ao FVIII independente de células T, relacionada principalmente à formação de anticorpos não neutralizantes e/ou de baixa afinidade (PORDES *et al.*, 2011).

A contribuição das células T reguladoras (Tregs) vem sendo evidenciada no processo de formação de anticorpos inibidores de FVIII. Tem sido demonstrado que diferentes subpopulações de células com atividade supressora estão envolvidas neste processo como: células Tregs supressoras CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, células Tr1 produtoras de IL-10 e células Treg CD8⁺. A ação efetiva das Tregs é considerada multifatorial, incluindo tanto mecanismos dependentes do contato celular (APCs e células T) quanto mecanismo “à distância” como supressão mediada por citocinas e outras moléculas supressoras. Acredita-se que a ação supressora possa dificultar a formação dos inibidores, mas os resultados dos estudos até o momento são insuficientes para o estabelecimento efetivo dessa associação (CAO *et al.*, 2009).

1.6 Anticorpos inibidores do FVIII

Em adição às artropatias hemofílicas, problemas venosos, hepatites viróticas e HIV, a formação de anticorpos inibidores do FVIII é uma das maiores complicações do tratamento da HA nos dias atuais.

De acordo com os dados da WFH estima-se que o número de pacientes com HA que desenvolveram anticorpos inibidores anti-FVIII em 2014 foi aproximadamente 3.242 em todo o mundo, dos quais 698 se referem ao Brasil e destes 71 no Estado de Minas Gerais (WFH, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Os anticorpos inibidores do FVIII são aloanticorpos policlonais do tipo IgG, principalmente da subclasse IgG4, que neutralizam funcionalmente o FVIII infundido através do bloqueio de epitopos funcionais da proteína (principalmente sítios antigênicos A2 e C2). Aproximadamente 95% dos inibidores ocorrem até a 75^a exposição ao FVIII e representa um agravo clínico importante nos pacientes com HA (PRESCOTT *et al.*, 1997; WIGHT & PAISLEY, 2003; GOUW *et al.*, 2013).

A neutralização ocasionada pelos inibidores pode ocorrer através de impedimento estérico, prevenindo as interações do FVIII com o FvW ou com plaquetas ativadas, bem como com outras moléculas da cascata de coagulação sanguínea, ou ainda, através da inibição direta da função procoagulante do FVIII. Os anticorpos inibidores do FVIII podem se comportar também como anticorpos catalíticos capazes de clivar o FVIII por hidrólise (BARROW *et al.*, 2001; LACROIX-DESMAZES *et al.*, 2002; LACROIX-DESMAZES *et al.*, 2003; WROBLEWSKA *et al.*, 2013).

Embora os mecanismos associados ao desenvolvimento dos inibidores não sejam completamente compreendidos, considera-se que a ocorrência de inibidores reflita uma resposta imune alogênica à administração repetida da proteína do FVIII exógena. Aproximadamente 25% dos pacientes com HA grave e 15% dos pacientes com HA moderada ou leve desenvolvem inibidores ao longo do tratamento de reposição. A ocorrência desses inibidores prejudica o tratamento dos pacientes, dificulta a evolução clínica e representa ainda um aumento considerável no custo do tratamento. De maneira geral, de 10-40% dos pacientes com HA apresentam inibidores capazes de inativar a atividade pró-coagulante do FVIII infundido (EHRENFORTH *et al.*, 1992; MOREAU *et al.*, 2000; BAYRY *et al.*, 2003).

Os pacientes com inibidores podem ou não manifestar sintomas clínicos, podendo ser detectados somente durante a avaliação laboratorial rotineira. A principal suspeita, porém é quando o quadro hemorrágico não é controlado adequadamente após o tratamento de reposição com concentrados de FVIII. Os anticorpos anti-FVIII podem ser quantificados por métodos imunoenzimáticos convencionais. Entretanto, a presença do inibidor é usualmente confirmada utilizando-se o teste de coagulação denominado teste de Bethesda. A positividade do teste deve ser confirmada em pelo menos duas amostras consecutivas, com intervalo de 2-4 semanas, apresentando um título de Bethesda $\geq 0,6$ UB/mL (VERBRUGGEN *et al.*, 1995;

VERBRUGGEN *et al.*, 2002). Uma unidade de Bethesda (UB) representa o inverso da diluição do plasma que neutraliza 50% do FVIII em um plasma normal. Quanto maior o número de UB, maior a quantidade de inibidores, sendo que títulos superiores ou iguais a 5 UB/mL são considerados títulos de inibidores de alta resposta e títulos inferiores a 5 UB/mL são considerados títulos de inibidores de baixa resposta (KASPER *et al.*, 1975; LAVIGNE-LISSALDE *et al.*, 2005).

Os recentes achados relacionados ao surgimento de anticorpos inibidores do FVIII contribuíram para a compreensão de que o desenvolvimento desses anticorpos é um processo multifatorial envolvendo: (I) aspectos associados ao paciente, como histórico familiar de inibidor, etnia, gravidade da HA e idade do paciente no momento da primeira exposição ao FVIII; (II) aspectos associados às mutações e/ou alterações do sistema imune (células do sistema imune, citocinas, quimiocinas e outras moléculas imunoregulatórias) e no gene *F8* (mutações do tipo deleções, inversões, *splicing*, *missense*, *nonsense*); e (III) aspectos relacionados ao tratamento como o tipo, a frequência, a intensidade de uso e a marca/tipo do FVIII infundido. Todos esses aspectos podem ser considerados importantes fatores de risco para o desenvolvimento de inibidores (AGOSTINI *et al.*, 2012; ASTERMARK *et al.*, 2013; COLLINS *et al.*, 2014; ASTERMARK, 2015).

1.7 Alternativas terapêuticas à presença dos inibidores do FVIII

A abordagem do paciente com HA e inibidor compreende controlar os episódios hemorrágicos e erradicar os inibidores. Os agentes *bypassing* são as opções terapêuticas para o tratamento dos pacientes com inibidores.

O uso de concentrados de complexos protrombínicos (CCP) ativado, contendo os fatores de coagulação II, VII, IX e X, pode estimular a formação de um coágulo sanguíneo e estancar a hemorragia. No entanto, esse tipo de terapia apresenta limitações, pois pode levar à trombose. O FVII recombinante ativado (rFVIIa) é uma outra opção de agente *bypassing*. O rFVIIa tem meia-vida curta e exige administração de múltiplas doses (a cada 2-4 horas) (DIMICHELE, 2000; BRAUN & BOSCH, 2000; ROCINO *et al.*, 2006; ASTERMARK *et al.*, 2007).

O tratamento de indução da imunotolerância (ITI) é indicado para pacientes com inibidores persistentes de alta resposta e requer infusões frequentes e periódicas de altas ou baixas doses de concentrados do FVIII, com objetivo de dessensibilizar o paciente com HA,

visando erradicar os anticorpos inibidores do FVIII, ou seja, tolerizar o paciente. Os mecanismos exatos de indução da tolerância através da ITI ainda não foram completamente elucidados, contudo, o conceito geral é baseado na teoria de que frequentes doses do FVIII contribuirão para diminuição da resposta imune ao FVIII infundido e, conseqüentemente, diminuirão os inibidores. O processo de imunotolerância atua possivelmente eliminando células efectoras por processos de ativação e exaustão celular. Embora seja uma terapia que tem mostrado uma efetividade considerável para a erradicação dos inibidores, a ITI tem um custo muito elevado e aproximadamente 1 em cada 4 pacientes apresenta falha terapêutica após a ITI (DIMICHELE, 2011; HAY & DIMICHELE, 2012; ATHALE *et al.*, 2014).

Atualmente, novas abordagens terapêuticas têm sido alvo de estudos laboratoriais associadas tanto à indução da tolerância ao FVIII quanto à erradicação dos inibidores como: a utilização de drogas imunossupressoras (ciclofosfamida, rapamicina, corticoesteróides e anticorpos monoclonais), a depleção de células T (anti-CD3), a depleção de células B (anti-CD20), a tolerância oral (antígenos do FVIII ou peptídeos do FVIII), a terapia celular (células dendríticas, macrófagos e células B), a terapia gênica (retrovírus, lentivírus, adenovírus e vetores não virais), a expressão de FVIII *ex-vivo* (plaquetas) e a ativação, expansão e recrutamento de células T reguladoras. Essas novas estratégias têm se mostrado potencialmente viáveis não somente por reduzir os custos com a utilização do FVIII, mas também por reduzir o tempo do tratamento e aumentar suas taxas de sucesso durante a imunotolerância ao FVIII, mas a maioria delas ainda está em fase de estudos preliminares e laboratoriais (SCOTT *et al.*, 2013; SCOTT, 2014).

1.8 Micropartículas plasmáticas circulantes

A ativação de células sanguíneas circulantes e do sistema vascular durante a coagulação, inflamação e apoptose é associada a um processo de vesiculação com remodelamento da membrana plasmática celular. Esse remodelamento resulta na liberação de micropartículas plasmáticas circulantes (MPs), que são fragmentos da membrana plasmática, ricos em fosfatidilserina (PS) exposta e proteínas de membrana de sua célula de origem. As MPs são formadas tanto em condições fisiológicas quanto em condições que a hemostase tecidual é alterada (ZWAAL & SCHROIT, 1997; OWENS & MACKMAN, 2011).

São consideradas MPs fragmentos celulares anucleados, que possuem um tamanho inferior a 1 micrômetro, PS presente em sua superfície externa, moléculas estimulatórias

(receptores de citocinas e quimiocinas, ácido araquidônico e DNA/RNA) em sua superfície ou interior e proteínas derivadas dos tipos celulares de origem (principalmente plaquetas, leucócitos, hemácias e células endoteliais) (FREYSSINET 2003; DISTLER *et al.*, 2006).

A expressão da PS em MPs pode contribuir com o potencial procoagulante das MPs, favorecendo a interação e ativação dos fatores da coagulação sanguínea. Pode haver ainda a expressão do TF nas MPs, o que pode favorecer a iniciação da coagulação. Nesse contexto, sugere-se que as MPs possam interferir em diferentes e relevantes processos fisiopatológicos (ZWAAL & SCHROIT 1997; COMBES *et al.*, 1999).

As MPs podem ser geradas em diferentes patologias como doenças hematológicas, trombóticas, cardiovasculares, câncer, malária, artrites, diabetes, dengue e doença de Alzheimer (THUSHARA *et al.*, 2015). No entanto, são limitados os dados sobre o perfil e possíveis funções das MPs na hemofilia, especialmente na HA e no contexto do desenvolvimento dos inibidores do FVIII.

Apesar dos estudos demonstrarem que a ocorrência de inibidores reflita uma resposta imune alogênica à administração repetida da proteína do FVIII exógena, os mecanismos imunológicos associados ao desenvolvimento dos inibidores ainda não foram completamente elucidados. A prevenção e a supressão dos aloanticorpos são os principais desafios na terapêutica da HA. Vale ressaltar ainda, que atualmente é impossível prever quem, dentro do grupo de pacientes com HA, desenvolverá anticorpos inibidores ou mesmo quando os anticorpos surgirão e quais os fatores associados à oscilação dos títulos de inibidores anti-FVIII ao longo do tratamento.

Nesse sentido, torna-se extremamente importante a realização de trabalhos que permitam estudar indivíduos sob risco de desenvolverem inibidores e, ao mesmo tempo, contribuir com informações relevantes para a geração de possíveis protocolos de imunoterapia que visem minimizar os impactos fisiopatológicos decorrentes das repetidas infusões proteicas e consequente produção de inibidores.

A capacidade de citocinas, quimiocinas e outras moléculas imunoregulatórias do sistema imune de alterar o perfil de imunogenicidade e a progressão clínica de pacientes têm sido amplamente estudadas em diversas enfermidades. Em alguns casos, intervenções que tem como alvo essas moléculas imunológicas já vêm sendo utilizadas como terapêuticas promissoras. Em função disso, considera-se de grande relevância o delineamento de aspectos imunológicos celulares e humorais de pacientes com HA e o estabelecimento de potenciais biomarcadores fenotípicos na hemofilia A relacionados ao desenvolvimento de inibidores de FVIII.

3.1 Objetivo geral

Avaliar biomarcadores fenotípicos celulares e humorais em diferentes grupos de pacientes com hemofilia A e sua associação com a presença de inibidores do FVIII.

3.2 Objetivos específicos

1. Analisar o perfil de citocinas intracitoplasmáticas de células do sistema imune inato e adaptativo presentes no sangue periférico de pacientes com hemofilia A, com e sem inibidores do FVIII;
2. Analisar o perfil de micropartículas plasmáticas (MPs) em pacientes com hemofilia A, com e sem inibidores do FVIII;
3. Verificar a presença de anticorpos na superfície de hemácias de pacientes com hemofilia A, com e sem inibidores do FVIII;
4. Determinar os índices de avidéz dos anticorpos anti-FVIII em amostras de pacientes com hemofilia A, com inibidores do FVIII.

4.1 Participantes da pesquisa e coleta das amostras

Os participantes incluídos nesta pesquisa foram pacientes com HA atendidos no Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação Hemominas (FH). O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FH, sendo o título do projeto original “Avaliação dos fatores clínicos, genéticos e imunológicos relacionados ao desenvolvimento de inibidores em hemofilia” (Parecer número 91.890). O estudo caso-controle teve início no ano de 2012 e foi finalizado no ano de 2015.

O convite para participação no estudo foi feito no momento da ida do paciente ao ambulatório da FH e no momento da doação de sangue na FH para os doadores. Foram incluídos pacientes com HA, classificados como HA moderada ou HA grave com base na atividade do FVIII residual presente no plasma e com dosagem de inibidores pelo teste de Bethesda. Não foram considerados aptos para participação na pesquisa os pacientes que tinham recebido infusão de concentrados de FVIII nos últimos 30 dias e tenham apresentado quadro infeccioso agudo nos últimos 20 dias. Os doadores de sangue foram selecionados após teste sorológico negativo para doença de Chagas, leishmaniose, vírus da imunodeficiência humana (HIV) e hepatites. Os pacientes e doadores foram informados sobre os objetivos do projeto de pesquisa e aqueles que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FH.

Os pacientes com HA e os doadores de sangue foram encaminhados ao Serviço de Coleta da FH onde coletaram 15 mL de sangue por punção venosa distribuídos em dois tubos do tipo *vacutainer* (BD, Franklin Lakes, NJ, USA), um tubo de 10 mL contendo heparina sódica e os 5 mL restantes em um tubo contendo citrato de sódio.

Após as coletas das amostras dos pacientes com HA, o primeiro teste a ser realizado foi o teste de Bethesda, para determinação da presença dos inibidores do FVIII e para posterior categorização dos pacientes. O teste de Bethesda foi realizado na rotina pelo Laboratório de Hematologia da FH e sua positividade confirmada em um segundo teste, com intervalo de duas semanas.

4.2 Imunofenotipagem de leucócitos e produção de citocinas intracelulares

4.2.1 Descrição das amostras

Foram coletadas amostras de sangue periférico em tubos contendo heparina sódica de 55 pacientes do sexo masculino com HA e 30 indivíduos sadios do sexo masculino sem HA. Os participantes foram distribuídos em três grupos: pacientes com histórico de inibidores [HA□-FVIII(+); n=25, com média de idade de $21,9 \pm 13,8$ anos], pacientes sem histórico de inibidores [HA□-FVIII(-); n=30, com média de idade de $27,6 \pm 16,6$ anos] e doadores de sangue [BD; n=30, com média de idade de $31,6 \pm 12,8$ anos]. Todos os pacientes foram classificados com HA grave e/ou moderada, tratados com dpFVIII na modalidade de tratamento sob demanda. Pacientes com HIV, HCV e outras doenças infecciosas e/ou inflamatórias foram excluídos.

4.2.2 Imunofenotipagem de leucócitos e produção de citocinas intracelulares

Amostras de sangue periférico foram utilizadas em culturas de curta duração realizadas em tubos de polipropileno, utilizando alíquotas de sangue total incubadas na presença de meio RPMI-1640 (Sigma, St Louis, MO, USA) e brefeldina A a $10 \mu\text{g/mL}$ (Sigma, St Louis, MO, USA) por 4 horas a 37°C em estufa a 5% de CO_2 . Após o período de incubação, as culturas foram tratadas com solução EDTA 2 mM (Sigma, St Louis, MO, USA) por 10 minutos à temperatura ambiente e lavadas duas vezes com PBS (Sigma, St Louis, MO, USA) por centrifugação a 1300rpm a 18°C por 7 minutos.

As células foram marcadas no escuro por 30 minutos a temperatura ambiente (TA) com os seguintes anticorpos monoclonais marcados com TC [TriColor] (Caltag, Burlingame, CA, USA), anti-CD4 (clone S3.5), anti-CD8 (clone M-L233), anti-CD14 (clone Tük4), anti-CD16 (clone 3G8) e anti-CD19 (clone 4G7). Após o procedimento de lise/fixação, os leucócitos foram lpermeabilizados por incubação com tampão de permeabilização fosfato-salina [tampão fosfato-salina (PBS) suplementado com 0,5% de saponina - Sigma, St Louis, MO, USA] por 10 minutos à TA. Em seguida as células foram incubadas por 30 minutos no escuro à TA na presença de anticorpos monoclonais anti-citocinas marcados com PE [Phycoerythrin] (IFN- γ , clone B27; TNF- α , clone MAB11; IL-4, clone MP4-25D2; IL-5,

clone TRFK5; e IL-10, clone JES3-9D7 [e-Bioscience, San Diego, CA, USA]) na presença do reagente permeabilizante.

As suspensões de leucócitos foram adquiridas em citômetro de fluxo (FACScalibur® - BD, Franklin Lakes, NJ, USA) adquirindo 30.000 eventos/amostra. Os dados obtidos foram analisados usando o software CellQuest (BD, Franklin Lakes, NJ, USA).

Distintas estratégias de seleção foram usadas para analisar a expressão de citocinas em subpopulações de leucócitos dos sistemas imune, inato (neutrófilos e monócitos) e adaptativo (subtipos de células T e linfócitos B). Os neutrófilos foram selecionados como células SSC^{High}CD16^{High+} e os monócitos como células CD14^{High+} em FL3/anti-CD16-TC ou FL3/anti-CD14-TC versus SSC (granulosidade), respectivamente. A população de linfócitos foi previamente selecionada em gráficos de FSC (tamanho) versus SSC (granulosidade). O número de neutrófilos, monócitos e linfócitos variou entre 19.500 a 22.500, 1.200 a 2.100 e 6.000 a 9.000, respectivamente.

Seguindo a seleção inicial, as frequências de células citocina⁺ foram quantificadas pela estatística dos quadrantes aplicando FL3/anti-marcador de superfície celular-TC versus FL2/anti-citocina-PE. Tubos distintos foram usados para avaliar o percentual de células T (CD4⁺ e CD8⁺) positivas para as citocinas e células B (CD19⁺). Os dados foram expressos como porcentagem de células citocinas positivas dentre neutrófilos, monócitos e linfócitos totais selecionados. Os resultados foram utilizados para calcular o perfil global das citocinas das células da resposta imune como proposto anteriormente por Chaves *et al.* (2010). Resumidamente, a média do percentual de cada população celular positiva para cada citocina avaliada foi calculada usando os valores obtidos para cada grupo de estudo [BD, HA α -FVIII(-) e HA α -FVIII(+)].

4.3 Análise do perfil de micropartículas plasmáticas (MPs)

4.3.1 Descrição das amostras

Foram coletadas amostras de sangue periférico em tubos contendo citrato de sódio de 66 pacientes do sexo masculino com HA e 40 indivíduos saudáveis do sexo masculino sem HA. Os participantes foram distribuídos em três grupos: pacientes com histórico de inibidores [HA \square -FVIII(+); n=31, com média de idade de 14,4 \pm 10,2 anos], pacientes sem histórico de inibidores [HA \square -FVIII(-); n=35, com média de idade de 18,0 \pm 13,3 anos] e doadores de sangue [BD; n=40, com média de idade de 18,5 \pm 18,8 anos]. Todos os pacientes foram

classificados com HA grave e/ou moderada e foram previamente tratados dpFVIII. Pacientes com HIV, HCV e outras doenças infecciosas e/ou inflamatórias foram excluídos.

4.3.2 Análise do perfil de micropartículas plasmáticas (MPs)

A quantificação de MPs foi realizada por citometria de fluxo em técnica adaptada de protocolos descritos anteriormente (COUPER *et al.*, 2010; CAMPOS *et al.*, 2010). Inicialmente, o sangue coletado em tubos contendo citrato de sódio foi centrifugado a baixa rotação (1.500 x g) por 15 minutos à TA para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). Em seguida, o PPP foi centrifugado a alta rotação (13.000 x g) por 5 minutos, para obtenção do plasma livre de plaquetas (PLP). Finalmente, o PLP foi diluído por três vezes em PBS contendo citrato de sódio (0,124 M) (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) e heparina (5.000 unidades) (Roche, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e novamente centrifugado por 90 minutos a 1.500 x g a 15°C. O sedimento rico em MPs foi ressuspensão em tampão de ligação de anexina V (BD, Franklin Lakes, NJ, USA). Foi adicionada anexina V FITC (BD, Franklin Lakes, NJ, USA), sabendo-se que a anexina reconhece resíduos de fosfatidilserina (PS) expostos que geralmente estão presentes na superfície das MPs. A caracterização fenotípica das MPs para determinação de sua origem celular foi realizada utilizando anticorpos monoclonais específicos (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) para plaquetas [anti-CD41a, clone HIP8/Peridinin-chlorophyll 5.5 (PERCP-Cy5.5)], leucócitos [anti-CD45, clone HI30/Allophycocyanin (APC)], monócitos [anti-CD14, clone Tük4/Peridinin-chlorophyll (PERCP)], granulócitos [anti-CD66, clone B6.2/CD66/Phycoerythrin (PE)], hemácias [anti-CD235a, clone GA-R2(HIR2)/Phycoerythrin Cyanin-5 (PECy5)] e células endoteliais [anti-CD51/61, clone 23C6/Phycoerythrin (PE)]. Após a adição dos anticorpos, as amostras foram incubadas por 30 minutos protegidas da luz à TA. Posteriormente, as amostras foram novamente ressuspensas em tampão de ligação de anexina V (BD, Franklin Lakes, NJ, USA). As MPs foram quantificadas por citometria de fluxo através da calibração com *microbeads* fluorescentes de tamanho conhecido (0,7 a 0,9 µm) (Sphertotech, Lake Forest, IL, USA). As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo FACScalibur® (BD, Franklin Lakes, NJ, USA), onde cerca de 100.000 eventos foram obtidos em cada amostra, sendo pelo menos 2.000 eventos dentro da região específica para MPs. Os dados obtidos foram analisados usando o software FlowJo (FlowJo, Ashland, OH, USA).

Com base na calibração realizada com as *microbeads* de tamanho conhecido delimitou-se a região correspondente às MPs. As MPs isoladas do plasma foram então

definidas de acordo com gráficos de FSC (tamanho) versus SSC (granulosidade). Seguindo a seleção inicial, as frequências de MPs foram quantificadas pela estatística dos quadrantes aplicando FL4/anti-marcador de superfície celular, FL3/anti-marcador de superfície celular, FL2/anti-marcador de superfície celular versus FL1/anti-anexina (Figura 4).

Para determinar o número de MPs por microlitro (MPs/ μL), o citômetro foi ajustado para realizar a leitura da amostra em alta velocidade (60 $\mu\text{L}/\text{segundo}$). O número de MPs/ μL de plasma foi calculado como descrito por Faille *et al.* (2009) de acordo com a seguinte fórmula: $\text{MPs}/\mu\text{L} = (\text{N} \times 400) / (60 \times 100)$, onde N é o número de eventos adquiridos na região das MPs, 400 é o volume total em cada tubo antes da fenotipagem, 60 é o volume de amostra analisada durante a fenotipagem e 100 é o volume original da suspensão de MPs.

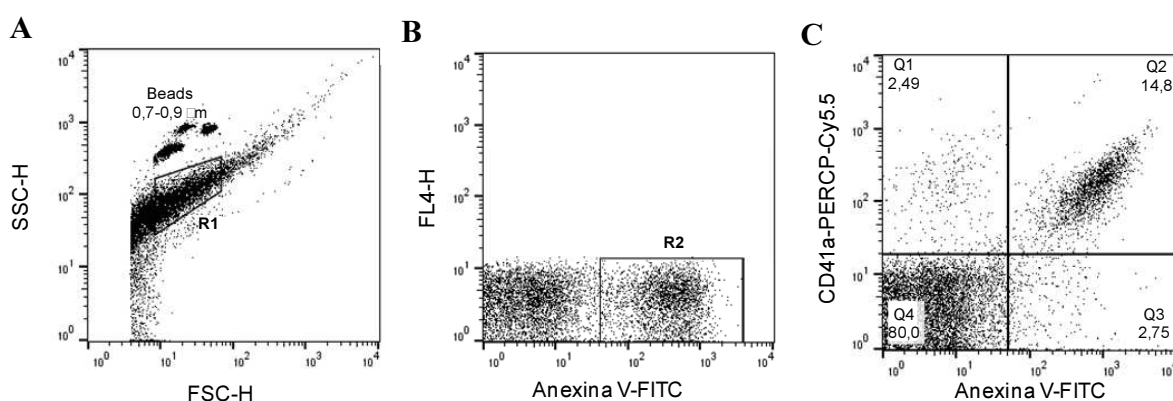


Figura 4: Estratégia de análise para identificação de micropartículas plasmáticas (MPs) por citometria de fluxo. As MPs foram selecionadas de acordo com seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Microesferas fluorescentes de tamanho definido (0,7-0,9 μm) foram utilizadas para delimitar a região das MPs (R1) (A). Os eventos presentes em R1 foram selecionados pela marcação positiva com anexina (R2) (B). Representação gráfica de MPs derivadas de plaquetas no quadrante duplo positivo (Q2) para anexina e CD41a (plaquetas) (C).

4.4 Verificação de anticorpos em hemácias

4.4.1 Descrição das amostras

Foram utilizadas as mesmas amostras descritas anteriormente para a determinação de micropartículas plasmáticas (MPs).

4.4.2 Verificação de anticorpos em hemácias

Para a verificação de anticorpos IgG na superfície de hemácias amostras de sangue periférico foram centrifugadas a 1.500 x g por 15 minutos para separação do plasma e das hemácias. O concentrado de hemácias foi diluído em PBS e incubado a TA com anticorpo anti-IgG humana conjugado com FITC (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA) por 30 minutos sob agitação. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 1.500 x g por 7 minutos e ressuspendidas em PBS. As amostras foram adquiridas e analisadas no citômetro de fluxo Accuri C6[®] e em software de análise do próprio equipamento (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) e pelo menos 50.000 eventos foram obtidos em cada amostra.

A população de hemácias foi selecionada de acordo com gráficos de FSC (tamanho) versus SSC (granulosidade). Seguindo a seleção inicial, as frequências de hemácias marcadas com anticorpo foram quantificadas pela estatística dos quadrantes (Figura 5).

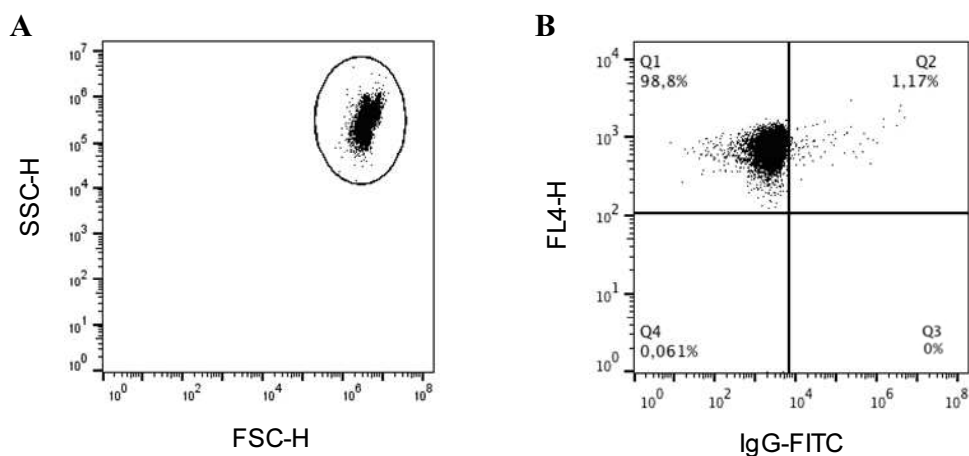


Figura 5: Perfil de análise das hemácias por citometria de fluxo. A população de hemácias foi selecionada de acordo com gráficos de FSC (tamanho) versus SSC (granulosidade) (A). Seguindo a seleção inicial, foram selecionados os quadrantes duplo positivos (Q2) para hemácias (autofluorescentes) e IgG-FITC em gráficos de densidade de fluorescência 4 versus fluorescência 1 (B).

Com a confirmação da presença de anticorpos na superfície das hemácias, realizou-se a determinação da presença de anticorpos IgG anti-FVIII em hemácias, comparando-se a presença de anticorpos IgG anti-FVIII no plasma. Para isso, as amostras de sangue periférico foram centrifugadas a 1.500 x g por 15 minutos para separação do plasma e do concentrado de hemácias. A técnica de Elisa para detecção de anticorpos IgG específicos ao FVIII foi

realizada conforme descrito por Chaves *et al.* (2008) (Chaves *et al.*, 2008).

Placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade (Nunc–Immuno Maxisorp; Nunc A/S, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas com uma solução de dpFVIII (Octavi® SDOptimum; Octapharma, Vienna, Austria) diluído em PBS (1 UI/mL) durante 18 horas a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS e Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com PBS-T contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA fração V, $\geq 96\%$ de pureza; Sigma), (PBS-TM 1%) por uma hora a 37°C. As amostras de concentrado de hemácias e plasma de cada paciente foram diluídas de 1:50 até 1:1.600 em PBS-TM 1% e incubadas em duplicata por uma hora a 37°C. Em seguida, todos os poços foram lavados por três vezes com PBS-T e incubados com os anticorpos anti-IgG total humano (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) conjugados com peroxidase diluídos 1:30.000 em PBS-TM 1%, respectivamente, por uma hora a 37°C. Após cinco lavagens com PBS-T, a reação foi revelada pela adição do substrato enzimático [4 mg de 1,2–diaminobenzene (OPD), 1,2 μ L de H₂O₂ 30% em 10 mL de tampão citrato 27 mM, 50 mM NaHPO₄, pH 5.0; (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA)] e interrompida com a adição de H₂SO₄ 1N. A densidade óptica (DO) foi determinada a 492 nm em leitor de microplacas.

4.5 Determinação dos índices de avidéz de anticorpos anti-FVIII

4.5.1 Descrição das amostras

Foram coletadas amostras de sangue periférico em tubos contendo citrato de sódio de 64 pacientes do sexo masculino com HA. Todos os pacientes avaliados tinham histórico de inibidor positivo [HA□-FVIII(+); n=64, com média de idade de $17,5 \pm 12,6$ anos]. Os pacientes foram classificados com HA grave e/ou moderada e tratados com dpFVIII. Pacientes com HIV, HCV e outras doenças infecciosas e/ou inflamatórias foram excluídos.

4.5.2 Determinação dos índices de avidéz de anticorpos anti-FVIII

Para a determinação dos índices de avidéz de anticorpos anti-FVIII as amostras de sangue periférico foram centrifugadas a 1.500 x g por 15 minutos para obtenção do plasma. Primeiramente, foi realizada a titulação das amostras de 1:10 até 1:2.000, através da técnica de Elisa convencional descrita anteriormente, para detecção de anti-IgG total humana (diluída 1:30.000), anti-IgG1 humana (diluída 1:500) e anti-IgG4 humana (diluída 1:90.000) [Sigma-

Aldrich, St. Louis, MO, USA]. Posteriormente, foi determinado o título ideal em que a DO de cada amostra foi de aproximadamente 0,7 para a realização da técnica de Elisa-Avidez.

A técnica de Elisa-Avidez foi realizada de acordo com a técnica de Elisa convencional descrita, exceto pela primeira lavagem após a incubação com as amostras de plasma, na qual os poços em duplicata foram submetidos a uma lavagem diferencial com uma solução de ureia 6 M em PBS por 10 minutos, enquanto a outra duplicata de poços foi lavada com PBS-T por 10 minutos. Posteriormente o protocolo foi continuado conforme Elisa convencional. Para a avaliação dos índices de avidéz das imunoglobulinas os resultados foram expressos como Índice de Avidéz (IA) e calculado como a razão entre os valores da DO obtidos das amostras tratadas com ureia (U^+) e das amostras não tratadas com ureia (U^-), seguindo a fórmula: $IA (\%) = [DO(U^+) / DO(U^-)] \times 100$.

4.6 Análises estatísticas

A determinação da normalidade da distribuição dos valores individuais para cada variável bem como as análises estatísticas foram realizadas empregando-se o *software GraphPad Prism 5* (San Diego, CA, USA). A comparação das frequências de cada população celular positiva para cada citocina avaliada, assim como a frequência de indivíduos acima da mediana foi realizada pelo teste de qui-quadrado. Foi assumida distribuição não-gaussiana e as comparações estatísticas foram realizadas usando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de comparação múltipla de Dunns para avaliar o perfil de micropartículas plasmáticas, a presença de anticorpos em hemácias e os índices de avidéz. As análises de correlações foram realizadas pelo teste de correlação de Spearman. As diferenças foram consideradas significativas quando os valores de p foram menores que 0,05.

5.1 Imunofenotipagem de leucócitos e produção de citocinas intracelulares

5.1.1 Imunidade inata (monócitos e neutrófilos)

As análises da imunofenotipagem de leucócitos e produção de citocinas intracelulares demonstraram uma menor frequência de monócitos TNF- α e IL-5 nos pacientes do grupo HA α -FVIII(+) quando comparado aos pacientes do grupo HA α -FVIII(-) e aos indivíduos do grupo BD respectivamente. Foi observada também uma maior frequência de monócitos TNF- α nos pacientes do grupo HA α -FVIII(-) quando comparado ao grupo BD. Os indivíduos dos três grupos apresentaram frequências similares de monócitos IL-4 e IL-10 (Figura 6).

As análises de neutrófilos demonstraram uma menor frequência de neutrófilos TNF- α nos pacientes do grupo de HA α -FVIII(+) quando comparado aos indivíduos dos outros grupos. Foi observada também uma maior frequência de neutrófilos IL-10 nos pacientes do grupo HA α -FVIII(+) quando comparado aos pacientes do grupo HA α -FVIII(-) e aos indivíduos do grupo BD. Além disso, uma menor frequência de neutrófilos IL-4 foi observada nos pacientes do grupo HA α -FVIII(+) quando comparado aos pacientes do grupo HA α -FVIII(-). Os indivíduos dos três grupos apresentaram frequências similares de neutrófilos IL-5 (Figura 6).

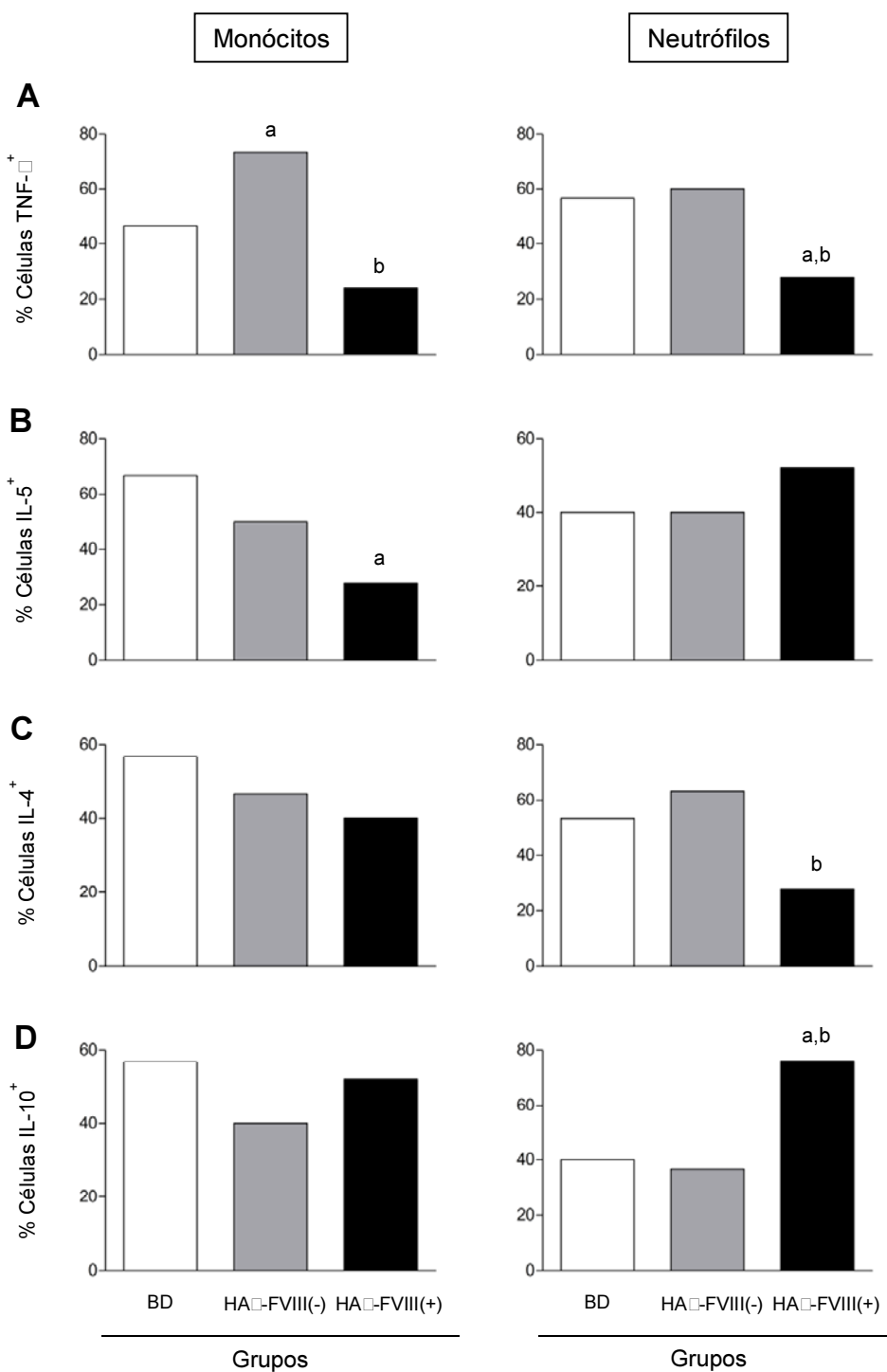


Figura 6: Análises do perfil de citocinas intracitoplasmáticas TNF- α (A), IL-5 (B), IL-4 (C) e IL-10 (D) de monócitos e neutrófilos do sangue periférico de indivíduos dos grupos BD (barras brancas), HA α -FVIII(-) (barras cinzas) e HA α -FVIII(+) (barras pretas). Os resultados foram expressos em gráfico de barras com representação do percentual médio e as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram representadas pelas letras “a” e “b” para comparações entre os grupos BD, HA α -FVIII(-) e HA α -FVIII(+), respectivamente.

5.1.2 Imunidade adaptativa (células T CD4⁺ e T CD8⁺ e linfócitos B)

As análises da imunofenotipagem de leucócitos e produção de citocinas intracelulares demonstraram frequências equivalentes de células T CD4⁺ e T CD8⁺ positivos para todas as citocinas avaliadas nos indivíduos do grupo BD.

Os pacientes do grupo HA α -FVIII(-) apresentaram frequências elevadas de pacientes com células T CD4⁺ e T CD8⁺ positivos para todas as citocinas avaliadas com exceção de IL-10 quando comparado aos indivíduos dos outros dois grupos. Além disso, os pacientes do grupo HA α -FVIII(+) apresentaram frequências inferiores de células T CD4⁺ e T CD8⁺ positivos para todas as citocinas avaliadas com exceção de IL-10 quando comparado aos indivíduos dos outros dois grupos (Figura 7).

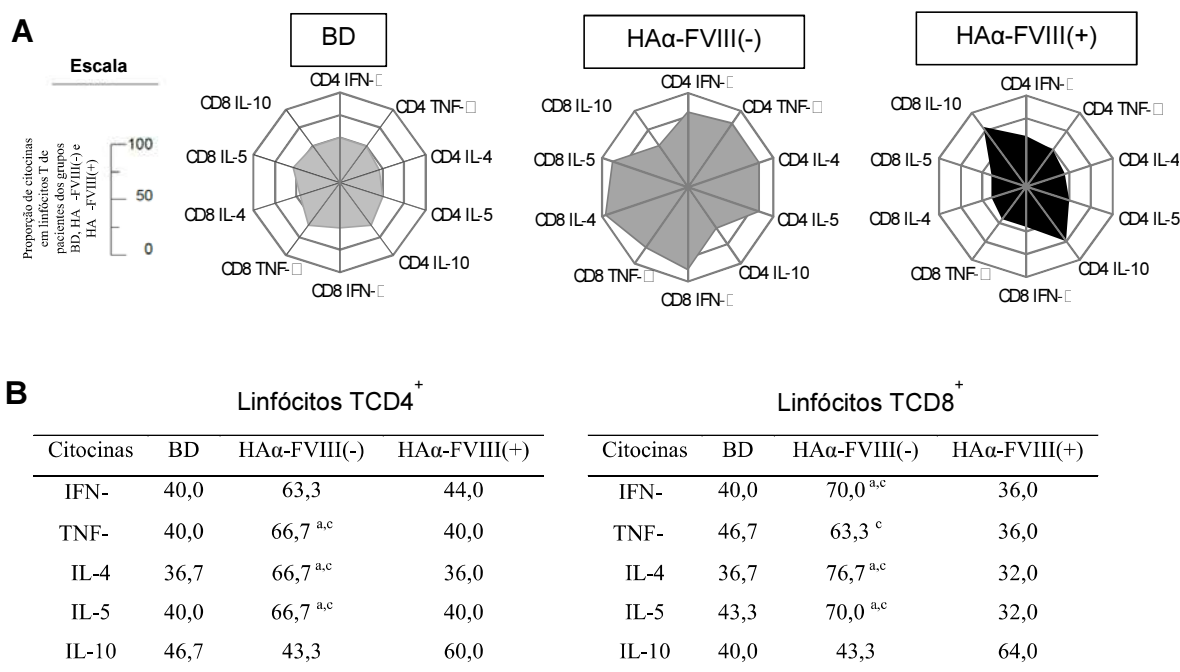


Figura 7: Análises do perfil de citocinas intracitoplasmáticas de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ do sangue periférico dos indivíduos dos grupos BD (radar cinza claro), HA α -FVIII(-) (radar cinza escuro) e HA α -FVIII(+) (radar preto) em gráficos de radar (A). Cada eixo do gráfico representa a proporção de cada linfócito positivo para cada citocina. As tabelas descrevem o percentual médio de indivíduos de cada subpopulação avaliada que estão acima da mediana global (B). Resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) foram representados pelas letras “a” e “c” para comparações entre os grupos BD e HA α -FVIII(+), respectivamente.

Foram observadas frequências superiores de linfócitos B IL-4 nos pacientes do grupo HA α -FVIII(-) quando comparado aos indivíduos do grupo BD. Foi observada também uma maior frequência de linfócitos B IL-10 nos pacientes do grupo HA α -FVIII(+) quando comparado aos indivíduos do grupo BD. Os três grupos apresentaram frequências similares de linfócitos B TNF- α e IL-5 (Figura 8).

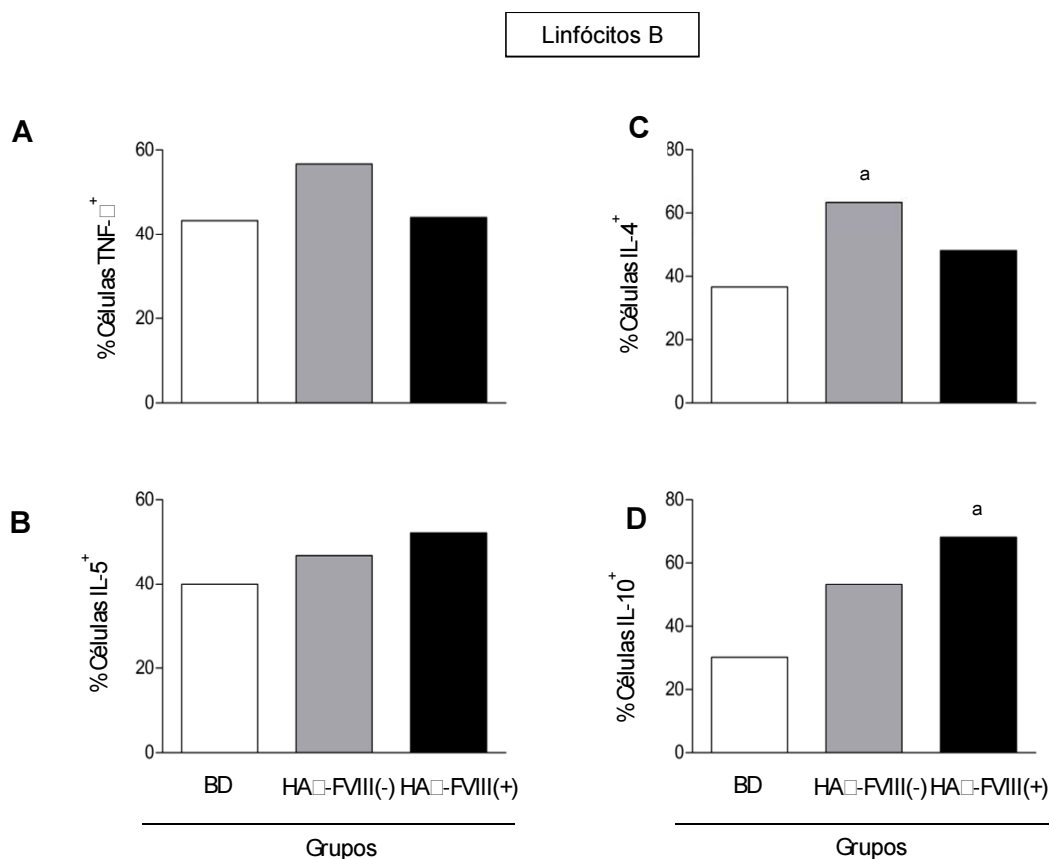


Figura 8: Análises do perfil de citocinas intracitoplasmáticas TNF- α (A), IL-5 (B), IL-4 (C) e IL-10 (D) de linfócitos B do sangue periférico de indivíduos dos grupos BD (barras brancas), HA α -FVIII(-) (barras cinzas) e HA α -FVIII(+) (barras pretas). Os resultados foram expressos em gráfico de barras com representação do percentual médio e as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram representadas pela letra “a” para comparações com o grupo BD.

5.2 Análise do perfil de micropartículas plasmáticas (MPs)

As análises de determinação de micropartículas plasmáticas (MPs) demonstraram uma frequência superior de MPs derivadas de células endoteliais, granulócitos e linfócitos T nos pacientes do grupo HA α -FVIII(-) quando comparado aos indivíduos dos outros dois grupos.

Uma maior frequência de MPs derivadas de células endoteliais e granulócitos foi verificada nos pacientes do grupo HA α -FVIII(+) somente quando comparado ao grupo BD.

A maior contribuição de MPs foi derivada de plaquetas nos indivíduos dos três grupos avaliados, mas não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos dos grupos estudados. Foram observadas também frequências equivalentes de MPs derivadas de monócitos e leucócitos nos indivíduos dos três grupos avaliados. Além disso, MPs derivadas de hemácias apresentaram frequências mais elevadas somente nos pacientes do grupo HA α -FVIII(+) quando comparado aos pacientes do grupo HA α -FVIII(-) (Figura 9 e Figura 10).

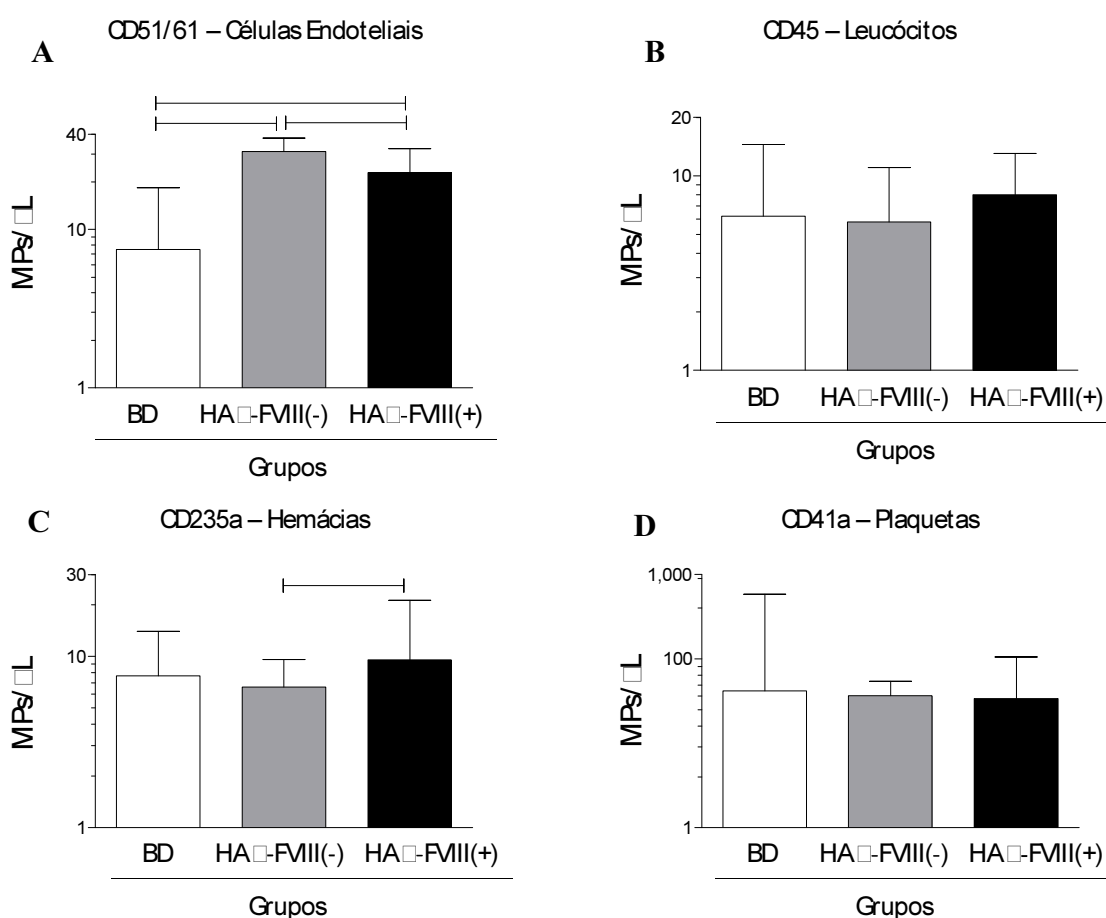


Figura 9: Determinação de micropartículas (MPs/ μ L em escala logarítmica) derivadas de células endoteliais (CD51/61) (A), leucócitos (CD45) (B), hemácias (CD235a) (C) e plaquetas (D) do plasma de indivíduos dos grupos BD (barras brancas), HA α -FVIII(-) (barras cinzas) e HA α -FVIII(+) (barras pretas). Os resultados foram expressos em gráfico de barras com representação da mediana e intervalo interquartil acima em escala logarítmica e as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram representadas por linhas niveladas para comparações entre os grupos BD, HA α -FVIII(-) e HA α -FVIII(+), respectivamente.

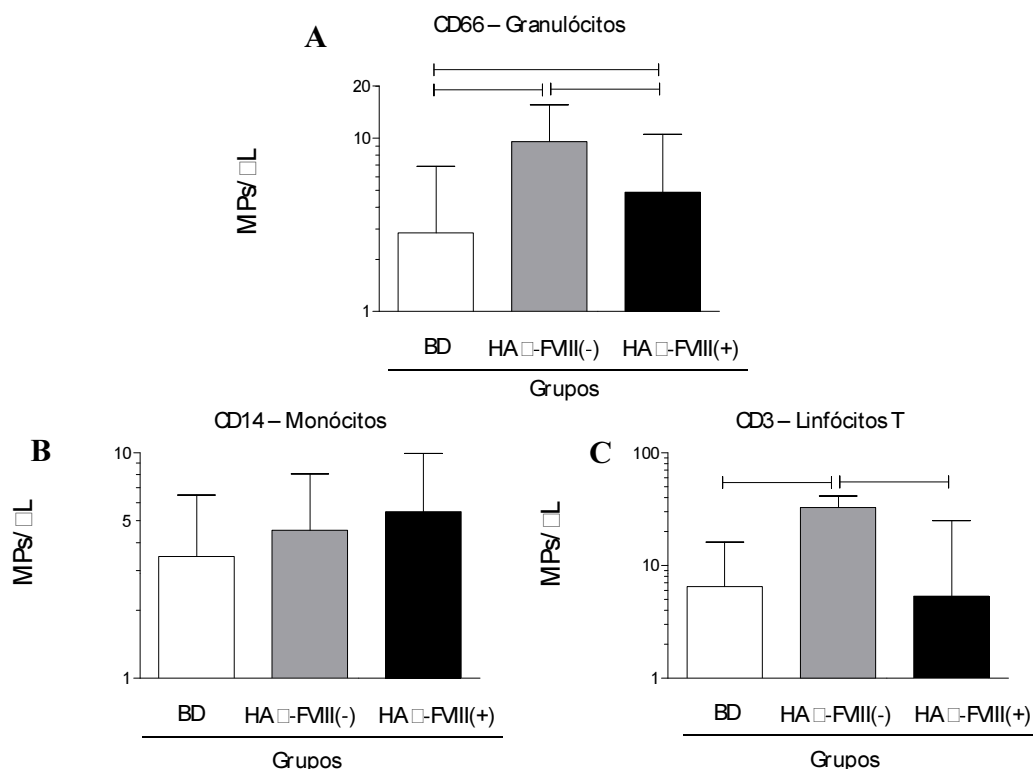


Figura 10: Determinação de micropartículas (MPs/□L em escala logarítmica) derivadas de granulócitos (CD66) (A), monócitos (CD14) (B), e linfócitos T (CD3) (C) do plasma de indivíduos dos grupos BD (barras brancas), HAα-FVIII(-) (barras cinzas) e HAα-FVIII(+) (barras pretas). Os resultados foram expressos em gráfico de barras com representação da mediana e intervalo interquartil acima em escala logarítmica e as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram representadas por linhas niveladas para comparações entre os grupos BD, HAα-FVIII(-) e HAα-FVIII(+), respectivamente.

5.3 Verificação de anticorpos em hemácias

Em função das frequências elevadas de MPs derivadas de hemácias nos pacientes do grupo HAα-FVIII(+), investigou-se a presença de anticorpos do tipo IgG na superfície de hemácias de indivíduos dos grupos BD, HAα-FVIII(-) e HAα-FVIII(+).

As análises de determinação de anticorpos em hemácias demonstraram que pacientes com HA apresentaram frequências superiores de anticorpos na superfície das hemácias quando comparado aos indivíduos do grupo BD. E entre os pacientes com HA, os pacientes do grupo HAα-FVIII(+) apresentaram uma maior frequência de anticorpos na superfície das hemácias (Figura 11).

Avaliou-se ainda a presença de anticorpos anti-FVIII em amostras de concentrado de hemácias e plasma de pacientes do grupo HAα-FVIII(+). Foi possível verificar a presença de

anticorpos anti-FVIII em amostras de concentrado de hemácias e plasma, sendo observada uma detecção superior de anticorpos no plasma (Figura 11). Não foi possível verificar a presença de anticorpos anti-FVIII em amostras de indivíduos dos demais grupos.

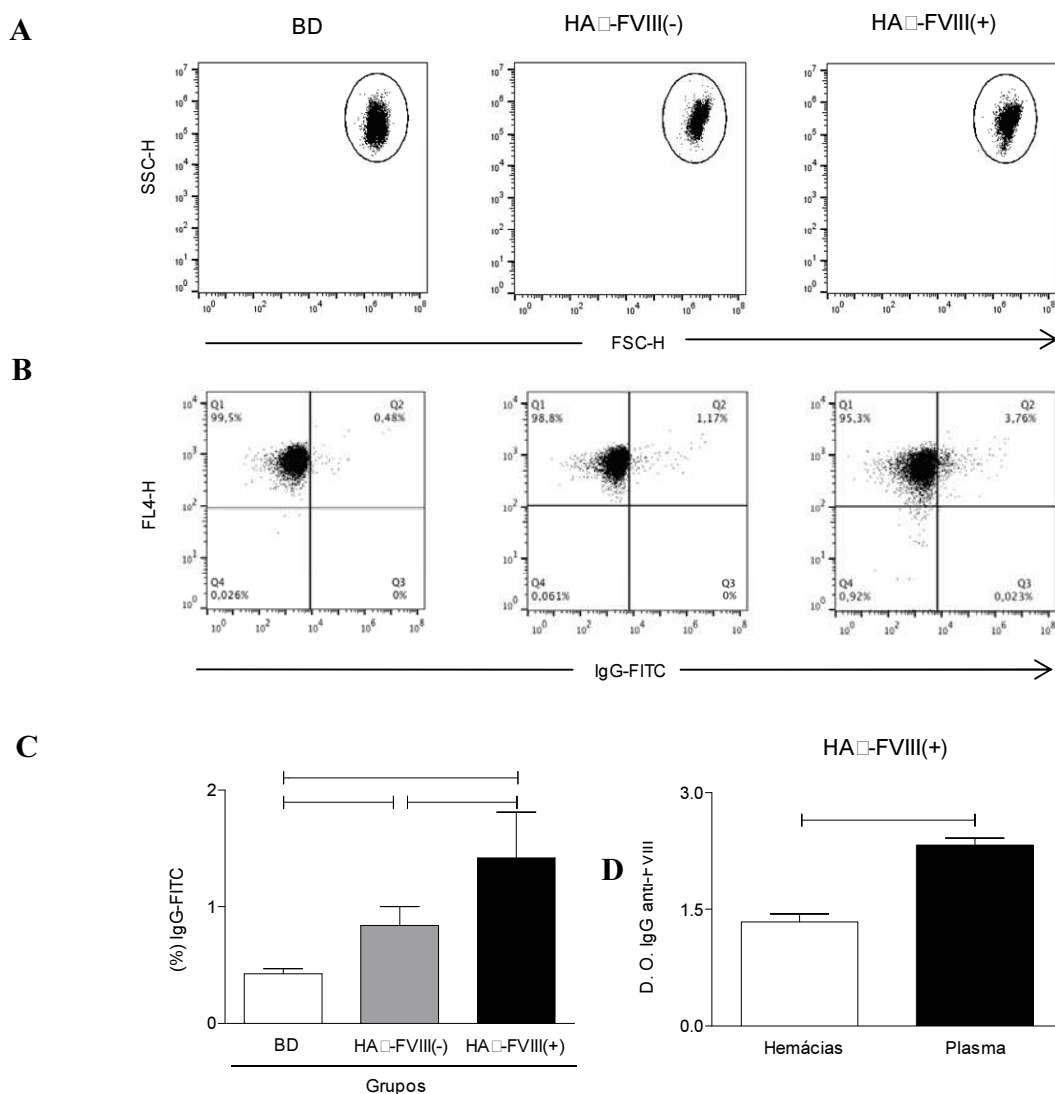


Figura 11: Representação gráfica do perfil de hemácias (A) e do percentual de anticorpos do tipo IgG em hemácias (B) de indivíduos dos grupos BD, HA α -FVIII(-) e HA α -FVIII(+). Determinação de anticorpos do tipo IgG em hemácias de indivíduos dos grupos BD (barra branca), HA α -FVIII(-) (barra cinza) e HA α -FVIII(+) (barra preta) (C). Determinação de anticorpos IgG anti-FVIII em concentrados de hemácias (barra branca) e plasma (barra preta) de pacientes do HA α -FVIII(+) (D). Os resultados (C e D) foram expressos em gráficos de barras com representação da mediana e intervalo interquartil acima em escala linear e as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram representadas por linhas niveladas para comparações entre os grupos BD, HA α -FVIII(-) e HA α -FVIII(+) e em hemácias e plasma, respectivamente.

No intuito de se comparar os títulos de anticorpos anti-FVIII em hemácias e no plasma calculou-se a mediana da DO na menor diluição (1:50), sendo a mediana da DO para hemácias de 1,309 e a mediana da DO para plasma de 2,534. As medianas da DO de hemácias e do plasma foram utilizadas ainda como *cutoff* para categorizar as amostras provenientes de pacientes com baixos e altos títulos de anticorpos anti-FVIII provenientes de hemácias e plasma.

Os pacientes categorizados quanto aos títulos de anticorpos detectados no Elisa e também quanto aos títulos de inibidores detectados pelo teste de Bethesda (alta resposta ≥ 5 UB/mL e baixa resposta < 5 UB/mL) foram comparados quanto aos níveis de todas as micropartículas plasmáticas avaliadas.

As análises dos grupos com baixos e altos títulos de anticorpos anti-FVIII provenientes de hemácias demonstraram uma frequência superior de MPs derivadas de hemácias em pacientes com baixos títulos de anticorpos. Já as análises dos grupos com baixos e altos títulos de anticorpos anti-FVIII provenientes do plasma não demonstraram nenhuma diferença significativa. Por sua vez, as análises dos grupos quanto aos títulos de inibidores demonstraram uma frequência superior de MPs derivadas de células endoteliais, granulócitos e linfócitos T em pacientes com inibidores de alta resposta e uma frequência superior de MPs derivadas de hemácias em pacientes com inibidores de baixa resposta. Isso demonstra que os níveis de MPs estão associados aos títulos de anticorpos anti-FVIII com caráter inibitório (Figura 12).

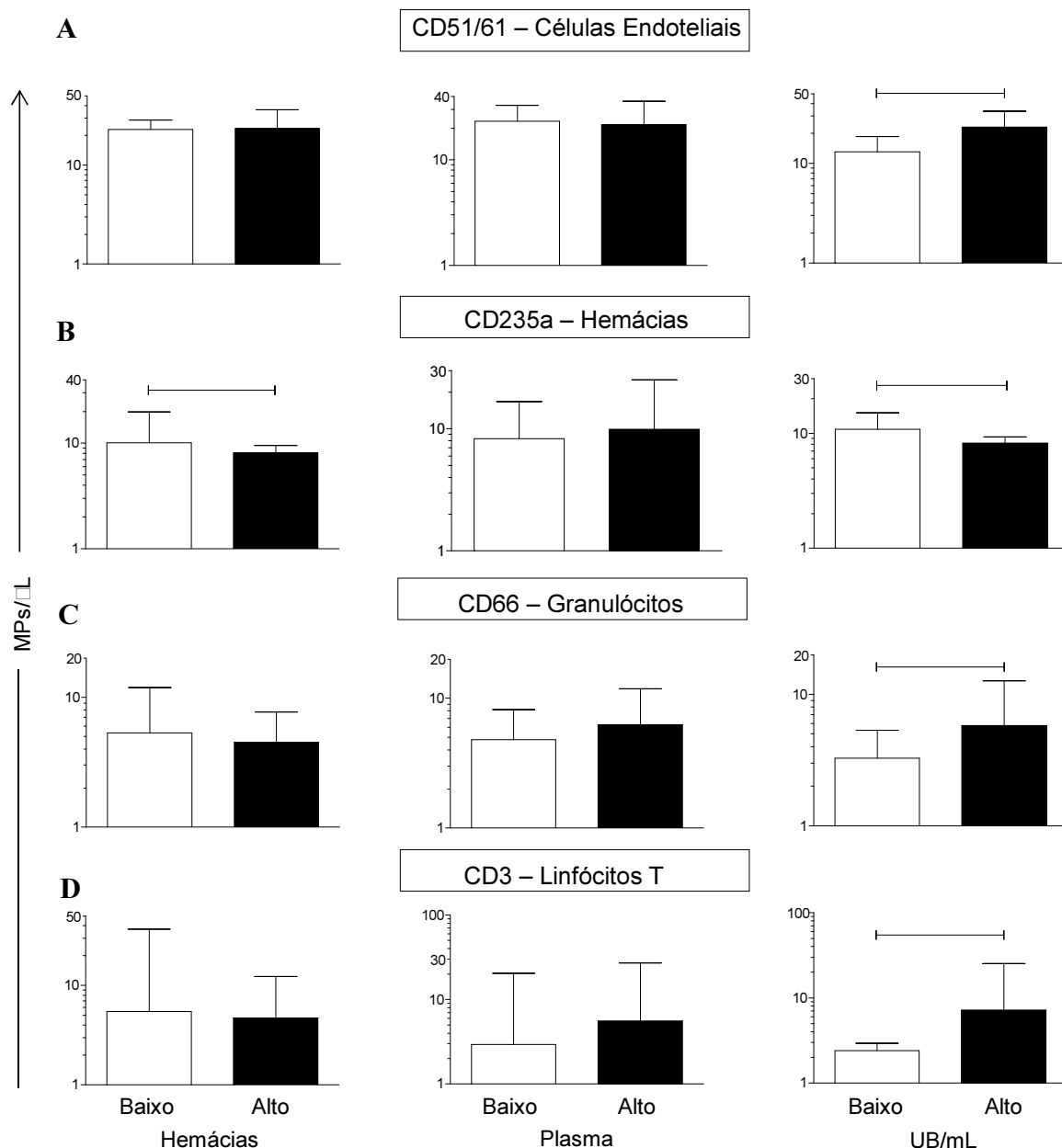


Figura 12: Determinação de micropartículas plasmáticas (MPs/ μ L em escala logarítmica) derivadas de células endoteliais (CD51/61) (A), hemácias (CD235a) (B), granulócitos (CD66) (C) e linfócitos T (CD3) (D) de pacientes do grupo HA α -FVIII(+) categorizados em baixo (barras brancas) e alto (barras pretas) título de anticorpos anti-FVIII provenientes de concentrados de hemácias, categorizados em baixo (barras brancas) e alto (barras pretas) título de anticorpos anti-FVIII provenientes do plasma e categorizados em baixo (barras brancas) e alto (barras pretas) título de inibidores. Os resultados foram expressos em gráfico de barras com representação da mediana e intervalo interquartil acima em escala logarítmica e as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram representadas por linhas niveladas para comparações entre os grupos categorizados.

5.4 Determinação dos índices de avidéz de anticorpos anti-FVIII

Para realizar a determinação dos índices de avidéz de anticorpos anti-FVIII primeiramente foi realizada a titulação de anticorpos IgG total e das subclasses IgG1 e IgG4 em amostras de pacientes do grupo HA α -FVIII(+) através da técnica de Elisa convencional.

Posteriormente, foi determinado o título ideal em que a DO de cada amostra foi de aproximadamente 0,7 para a realização da técnica de Elisa-Avidéz. As análises dos títulos de anticorpos anti-FVIII demonstraram diferentes níveis de anticorpos no grupo de pacientes avaliado. Em função da variabilidade observada, dividiu-se os pacientes em função da gravidade da HA (graves e moderados), o que possibilitou distinguir mais facilmente diferentes subgrupos de pacientes. A tabela 1 resume as principais características dos subgrupos formados em função da detecção das subclasses de anticorpos anti-FVIII no teste de Elisa-Avidéz.

Tabela 1. Características dos pacientes submetidos ao teste de Elisa-Avidéz.

Gravidade	N	Idade média (Mín-Max)	Diluição média (Mín-Max) Elisa-Avidéz
IgGT			
Grave	28	21,1 (2-44)	1:355,0 (1:80 - 1:520)
Moderado	36	14,6 (2-36)	1:324,4 (1:20 - 1:500)
IgG1			
Grave	7	17,0 (2-40)	1:124,3 (1:80 - 1:200)
Moderado	7	15,7 (9-30)	1:95,7 (1:50 - 1:200)
IgG4			
Grave	20	18,7 (2-44)	1:694,0 (1:25 - 1:2000)
Moderado	21	15,4 (2-33)	1:204,0 (1:10 - 1:2000)

Com relação às análises da DO de amostras não tratadas com ureia (U-) e amostras tratadas com ureia (U+) no teste de Elisa-Avidéz foi observado DO superior em amostras U- quando comparado a amostras U+, especialmente para a subclasse IgG4, conforme esperado, devido ao rompimento das interações entre anticorpos e antígenos provocado pela adição de ureia (Figura 13).

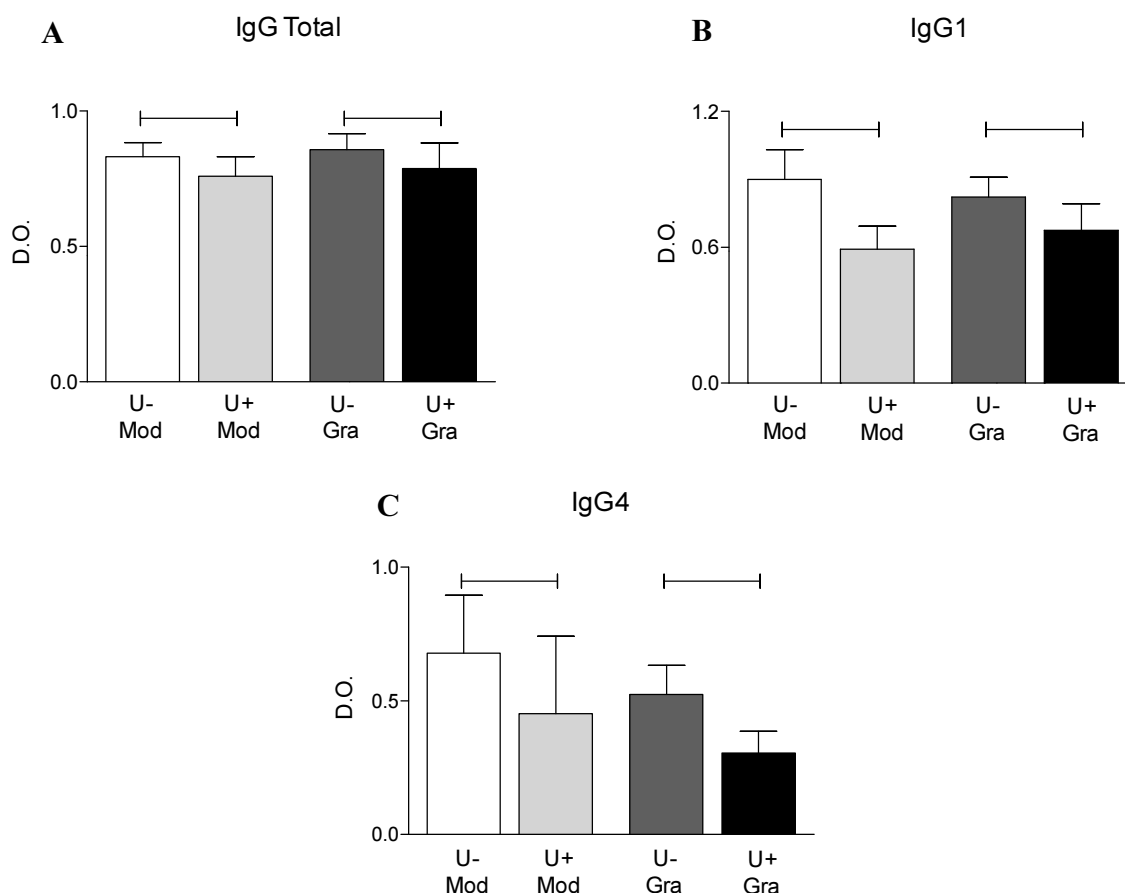


Figura 13: Densidade óptica das amostras não tratadas com ureia de pacientes com HA moderada (barras brancas), amostras tratadas com ureia de pacientes com HA moderada (barras cinzas claro), amostras não tratadas com ureia de pacientes com HA grave (barras cinzas escuro) e amostras tratadas com ureia de pacientes com HA grave (barras pretas) detectadas no Elisa-Avidez de anticorpos IgG total (A) e das subclasses IgG1 (B) e IgG4 anti-FVII (C). Os resultados foram expressos em gráfico de barras com representação da mediana e intervalo interquartil acima em escala linear e as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram representadas por linhas niveladas para comparações entre os grupos categorizados.

A avaliação dos índices de avidéz (IA) demonstrou que pacientes classificados como moderados apresentaram uma avidéz superior de anticorpos IgG total anti-FVIII quando comparado a anticorpos IgG4 anti-FVIII e uma maior avidéz de anticorpos IgG1 anti-FVIII quando comparado a anticorpos IgG4 anti-FVIII. Pacientes classificados como grave apresentaram uma avidéz superior de anticorpos IgG total anti-FVIII quando comparado aos anticorpos IgG1 anti-FVIII e IgG4 anti-FVIII e ainda avidéz superior de IgG1 anti-FVIII

quando comparado aos anticorpos IgG4 anti-FVIII. Foi observada ainda um maior IA de anticorpos IgG4 anti-FVIII em pacientes classificados como moderados quando comparados aos pacientes classificados como graves (Figura 14).

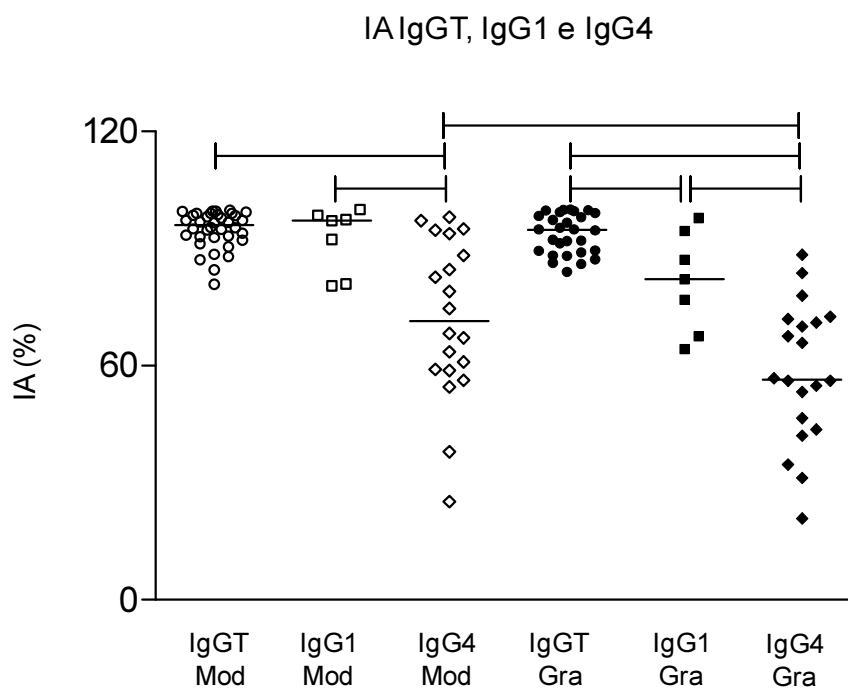


Figura 14: Índice de Avidéz em percentual de anticorpos IgG total e das subclasses IgG1 e IgG4. Cada linha representa a mediana do IA e cada símbolo um paciente do grupo HA α -FVIII(+). O IA de IgG total de pacientes com HA moderada (círculos não preenchidos), IA de IgG1 de pacientes com HA moderada (quadrados não preenchidos), IA de IgG4 de pacientes com HA moderada (losangos não preenchidos), IA de IgG total de pacientes com HA grave (círculos preenchidos), IA de IgG1 de pacientes com HA grave (quadrados preenchidos) e IA de IgG4 de pacientes com HA grave (losangos preenchidos). Resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) foram representados por linhas niveladas para comparações entre os grupos categorizados.

O índice de avidéz de IgG total e IgG1 de pacientes HA α -FVIII(+) classificados como moderados e graves não foram correlacionados com os títulos de Bethesda, contudo o IA da subclasse IgG4 de pacientes graves demonstrou uma correlação negativa moderada com os títulos de Bethesda, o que não foi observado para pacientes classificados como moderados (Figura 15).

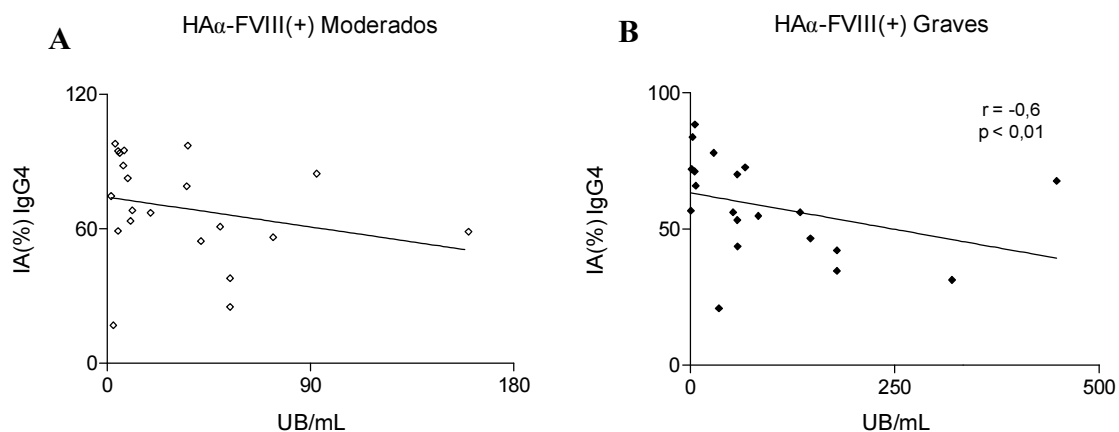


Figura 15: Correlações entre o IA (%) de IgG4 anti-FVIII e os títulos de Bethesda (UB/mL) de pacientes HA α -FVIII(+) classificados como moderados (A) e graves (B). Correlações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram representadas por seu valor de p e o coeficiente de correlação por seu valor de r .

A produção de anticorpos inibidores do FVIII é a principal complicação do tratamento da hemofilia A, porém os mecanismos imunológicos associados ao desenvolvimento dos inibidores ainda não foram completamente elucidados. Nesse sentido, a avaliação de biomarcadores fenotípicos celulares e humorais na HA visa contribuir com a compreensão da compartimentalização da resposta imune. Assim, a primeira parte desse trabalho teve como objetivo caracterizar o perfil de citocinas intracitoplasmáticas de células do sistema imune inato e adaptativo presentes no sangue periférico de pacientes com hemofilia A, com e sem inibidores do FVIII, tendo como referência os resultados de doadores de sangue sem hemofilia.

As análises referentes ao perfil de citocinas de leucócitos demonstraram a predominância de uma resposta imune anti-inflamatória/reguladora em células da imunidade inata e adaptativa em pacientes com inibidores, com menor frequência de monócitos e neutrófilos TNF- α , monócitos IL-5 e neutrófilos IL-4 e uma maior frequência de neutrófilos, linfócitos T CD4⁺, linfócitos T CD8⁺ e linfócitos B IL-10. Esses resultados enfatizam que o perfil de citocinas anti-inflamatórias/reguladoras nas células da imunidade inata e adaptativa é de alguma forma relacionado à presença de inibidores do FVIII.

Por outro lado, as análises referentes ao perfil de citocinas de leucócitos do sangue periférico demonstraram a predominância de uma resposta pró-inflamatória em células da imunidade inata e adaptativa em pacientes sem inibidores, com uma maior frequência de monócitos TNF- α e linfócitos B IL-4 e uma menor frequência de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ IL-10. Os resultados do presente estudo enfatizam que o perfil de citocinas pró-inflamatórias nas células da imunidade inata e adaptativa está relacionado de alguma forma à ausência de inibidores do FVIII.

Os neutrófilos têm sido associados à síntese de citocinas em resposta a diferentes estímulos inflamatórios em doenças crônicas (como artrite reumatoide, doença intestinal inflamatória, diabetes e diversas infecções) e também com a regulação da resposta imune, como sugerido na HA. Estudos têm proposto ainda que o perfil de citocinas produzidas por neutrófilos seja semelhante ao perfil de citocinas produzidas por monócitos e macrófagos. Portanto, a modulação de citocinas derivadas de monócitos e neutrófilos parece ter um relevante papel na regulação da resposta imune, podendo ainda, ser uma potencial estratégia para futuras terapias imunológicas (KASAMA *et al.*, 2005; HATANAKA *et al.*, 2006; WRIGHT *et al.*, 2010).

A resposta do sistema imune à terapia de reposição do FVIII está associada ao desenvolvimento de uma resposta imune clássica dependente da ativação de linfócitos T CD4⁺ e consequente produção de anticorpos por linfócitos B. O FVIII infundido é reconhecido, internalizado e processado por APCs e apresentado a linfócitos T CD4⁺. Durante esse processo de estimulação as células T podem induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias/reguladoras e, em consequência desse microambiente, promover a ativação de linfócitos B, resultando na síntese de anticorpos anti-FVIII com caráter inibitório. Ainda nesse contexto, células B de memória também podem ser estimuladas (HU *et al.*, 2007; WROBLEWSKA *et al.*, 2013; ASTERMARK *et al.*, 2013; ASTERMARK *et al.*, 2015). Considerando o exposto, os linfócitos T CD4⁺ têm uma significativa importância na resposta imune ao FVIII, assim como relatado neste trabalho.

Por outro lado, estudos têm descrito uma contribuição considerável de linfócitos T CD8⁺ no contexto de regulação da resposta imune. Linfócitos T CD8⁺ estão associados com a indução da tolerância imune funcionando como células T reguladoras, possivelmente através da supressão de células T ativadas pela produção de IL-10 ou por meio de células citotóxicas CD8⁺ que podem mediar a apoptose de células T (Le GAL *et al.*, 1999; ENDHARTI *et al.*, 2005; SHI *et al.*, 2009; HERDON *et al.*, 2005). A proliferação de células supressoras CD8⁺ e linfócitos T CD8⁺ ativados já foram descritos em pacientes com HA e a proliferação dessas células supressoras parece estar relacionada às repetidas infusões de FVIII (DIANZANI *et al.*, 1988; MATSUTANI *et al.*, 2003; SAKURAI *et al.*, 2011). Diante disso, acredita-se que a produção de IL-10 por células T CD8⁺ em pacientes com inibidores possa estar relacionada a um perfil de regulação da resposta imune.

A contribuição das citocinas secretadas pelas células B tem sido relatada na literatura. Rosado e colaboradores (2008) relataram que a citocina IL-10 tem um importante papel em respostas anti-inflamatórias, contribuindo para a síntese de todos os tipos de imunoglobulinas por linfócitos B (ROSADO *et al.*, 2008). Brière e colaboradores (1994) por sua vez, relacionaram a secreção de anticorpos IgG1 à síntese de IL-10 por linfócitos B (BRIÈRE *et al.*, 1994). Ao passo que Rousset e colaboradores (1992) sugeriram que a predominância da secreção de IL-10 por linfócitos B, em pacientes com inibidores, pode estar relacionada à regulação da secreção de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-1 α influenciando um microambiente ideal para a produção de anticorpos inibidores (ROUSSET *et al.*, 1992). Esses achados evidenciam que a função das células B não se limita à produção de anticorpos, podendo contribuir com a regulação da resposta imune e secreção de citocinas que amplificam a resposta imune celular.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, o microambiente composto de citocinas anti-inflamatórias/reguladoras secretadas por monócitos, neutrófilos, células T e células B favoreça a síntese de anticorpos anti-FVIII com atividade inibitória. Já um microambiente composto de citocinas pró-inflamatórias favoreça a síntese de anticorpos anti-FVIII sem atividade inibitória.

Estudos prévios têm demonstrado que o contexto imunológico durante o tratamento de reposição de FVIII influencia o desenvolvimento de anticorpos anti-FVIII com e sem caráter inibitório. A associação entre a resposta imune anti-inflamatória/reguladora e a síntese de inibidores do FVIII e entre a resposta imune predominantemente pró-inflamatória e a síntese de anticorpos sem atividade inibitória já tem sido relatada na literatura (HU *et al.*, 2007; REDING *et al.*, 2002; van HELDEN *et al.*, 2008; CHAVES *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2013; PIMENTEL *et al.*, 2013). Esses dados evidenciam a importância das citocinas agindo como mediadores da resposta imune.

É importante salientar ainda que os genes que codificam IL-10 e TNF- α foram os primeiros genes, além do gene do FVIII, a serem associados à produção de inibidores do FVIII na HA, sugerindo que a secreção dessas citocinas poderia ter um impacto considerável no contexto da resposta imune ao FVIII (ASTERMARK *et al.*, 2006a, ASTERMARK *et al.*, 2006b; CHAVES *et al.*, 2010).

Hu e colaboradores (2007) sugerem inclusive que um perfil de citocinas pró-inflamatórias estaria relacionado a uma resposta imune inicial ao FVIII e que a conversão para um perfil de citocinas anti-inflamatórias/reguladoras representaria um ponto decisivo para o desenvolvimento de anticorpos inibidores do FVIII.

Os resultados obtidos na primeira parte deste trabalho demonstraram que foi possível identificar biomarcadores fenotípicos celulares relevantes associados a pacientes com e sem inibidores do FVIII.

O presente estudo também teve como objetivo analisar o perfil de micropartículas plasmáticas em pacientes com e sem inibidores de FVIII. As MPs podem ser originadas de diferentes tipos celulares em condições fisiológicas, porém as MPs encontram-se aumentadas em condições em que a hemostase tecidual é alterada, principalmente com relação a processos inflamatórios e sistêmicos, como pode ocorrer em pacientes com HA (ZWAAL & SCHROIT, 1997; OWENS & MACKMAN, 2011; THUSHARA *et al.*, 2015).

Os processos de ativação celular e apoptose são associados a um remodelamento da membrana plasmática, resultando na liberação de micropartículas plasmáticas ricas em fosfatidilserina (PS) exposta. A PS exposta nas MPs pode se ligar a diferentes fatores da

coagulação sanguínea tendo um potencial procoagulante importante. Além da PS, as MPs podem expressar ainda fator tissular (TF), que pode favorecer a iniciação da cascata de coagulação, condições que são de grande relevância no contexto da HA (ZWAAL & SCHROIT, 1997; COMBES *et al.*, 1999; OWENS & MACKMAN, 2011).

Morel e colaboradores (2006) demonstraram que a superfície de MPs é um local eficiente para a formação de trombina, demonstrando que um aumento de MPs pode ser associado à coagulação sanguínea mais eficiente (MOREL *et al.*, 2006). Nesse contexto, as MPs podem interferir em diferentes processos fisiopatológicos como hemostasia, inflamação, apoptose, remodelamento vascular e angiogênese (BERCKMANS *et al.*, 2001; LEROYER *et al.*, 2007).

São limitados os dados sobre as origens e os níveis de MPs em pacientes com hemofilia A. Nosso estudo foi o primeiro a relatar evidências de que os níveis de MPs são significativamente diferentes em função da presença ou ausência de inibidores do FVIII. Os poucos relatos publicados na literatura que avaliaram a presença de MPs na HA relacionaram alterações dos níveis de MPs ao tratamento da HA e à idade dos pacientes com HA.

Proulle e colaboradores (2004) descreveram que pacientes com inibidores tratados com rFVIIa tinham um aumento transitório de MPs, principalmente de MPs derivadas de plaquetas. Contudo, deve-se considerar que o grupo de pacientes avaliados no trabalho foi composto de pacientes com HA e HB, sendo apenas 15 pacientes com inibidores e apenas 6 desses pacientes ter apresentado um pico transitório de MPs. É importante considerar ainda que a coleta das amostras foi realizada imediatamente após o tratamento dos pacientes, fatores que podem ter influenciado as dosagens de MPs (PROULLE *et al.*, 2004).

Proulle e colaboradores (2005) observaram um aumento significativo nos níveis de MPs em pacientes com HA menores de 18 anos, sendo a idade o único parâmetro que apresentou relação aos níveis de MPs. No entanto, é importante ressaltar que o grupo de pacientes foi composto de pacientes com HA e HB, sendo a amostra constituída por 18 pacientes com inibidores, a coleta das amostras realizada logo após a submissão do paciente ao tratamento e alguns pacientes apresentarem hemorragias durante a coleta das amostras, fatores esses que podem ter influenciado os resultados observados (PROULLE *et al.*, 2005).

Mobarrez e colaboradores (2012) descreveram uma diminuição de MPs associada a uma melhora na hemostasia após o tratamento com FVIII em pacientes com HA tratados sob demanda, sugerindo que as MPs seriam incorporadas ao tampão hemostático formado após a infusão do FVIII. No entanto, essa avaliação foi realizada em somente 18 pacientes com HA e

a coleta das amostras realizada em até 20 horas após o tratamento, o que pode ter influenciado os resultados observados (MOBARREZ *et al.*, 2012).

Nossas análises referentes à determinação das MPs demonstraram uma grande variedade de níveis e origens celulares de MPs tanto em pacientes com HA quanto em pacientes do grupo controle, conforme já esperado. A maior contribuição de MPs foi derivada de plaquetas nos pacientes com HA. Foi observado ainda um aumento expressivo de MPs derivadas de células endoteliais, granulócitos e linfócitos T em pacientes com HA sem inibidores. MPs derivadas de hemácias apresentaram um aumento somente em pacientes com inibidores. Os dados do presente estudo sugerem a participação de diferentes células no contexto do desenvolvimento e supressão dos inibidores.

Proulle e colaboradores (2004, 2005) e Mobarrez e colaboradores (2012) também descreveram uma maior contribuição de MPs derivada de plaquetas em pacientes com HA e uma menor contribuição de MPs derivadas de leucócitos (PROULLE *et al.*, 2004; PROULLE *et al.*, 2005; MOBARREZ *et al.*, 2012).

Tem sido bem estabelecido na literatura que mais de 80% das MPs circulantes carregam antígenos originados de plaquetas ou megacariócitos, indicando que MPs derivadas de outras células representam a minoria de MPs circulantes (FLAUMENHAFT *et al.*, 2009).

MPs derivadas de células endoteliais desempenham um papel biológico importante nos processos de coagulação, inflamação e hemostase vascular. Nesse contexto, a secreção de citocinas pró-inflamatórias por células endoteliais no local do dano vascular tem sido bem estabelecida na literatura (CHIRONI *et al.*, 2009; MOREL *et al.*, 2009; DIGNAT-GEORGE & BOULANGER, 2011). As MPs derivadas de células endoteliais podem estar contribuindo com a presença de citocinas pró-inflamatórias observada nos pacientes com HA sem inibidores. Os níveis elevados de MPs derivadas de células endoteliais podem ainda estar associados com a regulação da hemostase e formação do tampão plaquetário, promovendo a ativação da cascata de coagulação, podendo estar associada à formação mais eficiente do coágulo de fibrina (ENJETI & SELDON, 2012).

O perfil de citocinas de leucócitos demonstrou que granulócitos e linfócitos têm um papel determinante na promoção de um microambiente adequado para a presença ou ausência de anticorpos inibidores do FVIII, sugerindo que essas células poderiam estar em processo de ativação, promovendo assim a produção e liberação de MPs.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, o aumento dos níveis de MPs derivadas de células endoteliais, granulócitos e linfócitos em pacientes com HA sem inibidores podem estar associado ao microambiente pró-inflamatório observado nesses

pacientes e que MPs derivadas de hemácias estariam associadas aos pacientes com inibidores. Acredita-se ainda que os níveis dessas MPs possam ser considerados relevantes biomarcadores fenotípicos celulares no contexto da ausência e presença de inibidores do FVIII.

Devido aos níveis elevados de MPs derivadas de hemácias em pacientes com inibidores, investigamos mais profundamente qual seria o papel das hemácias nesse contexto.

Inicialmente, investigamos presença de anticorpos na superfície de hemácias de pacientes com e sem inibidores do FVIII. As análises demonstraram que pacientes com HA apresentaram níveis elevados de anticorpos do tipo IgG na superfície das hemácias, principalmente pacientes com inibidores. Foi possível ainda, detectar anticorpos do tipo IgG anti-FVIII em concentrado de hemácias de pacientes com inibidores.

Os resultados observados sugerem que os elevados níveis de anticorpos na superfície de hemácias em pacientes com inibidores possam estar relacionados à presença de anticorpos anti-FVIII em hemácias, contribuindo com reações hemolíticas desse grupo de pacientes, provavelmente através de reações via complemento e consequentemente contribuindo para o aumento dos níveis de MPs derivadas de hemácias.

Segundo De Back *et al.* (2014) as hemácias sob condições estressantes ou danificadas são removidas da circulação ou degradadas por macrófagos localizados principalmente no baço, mas também no fígado (DE BACK *et al.*, 2014). Provavelmente, a sensibilização das hemácias pelos anticorpos seria uma dessas condições estressantes que estariam relacionadas à remoção das hemácias.

A chance do FVIII circulante de interagir com hemácias pode ser considerada pequena em função dos níveis de FVIII circulante em comparação com outros antígenos proteicos. Entretanto, Uszynski (1974) e Laurian *et al.* (1982) descreveram hemácias revestidas por FVIII e sugeriram que os anticorpos anti-FVIII poderiam interagir com essas hemácias (USZYNSKI, 1974; LAURIAN *et al.*, 1982). Com isso, talvez o FVIII residual presente no plasma dos pacientes com HA, assim como, o FVIII infundido durante o tratamento da HA, possam interagir com as hemácias desses pacientes.

A categorização dos pacientes quanto aos títulos de anticorpos anti-FVIII provenientes de hemácias demonstrou um aumento de MPs derivadas de hemácias em pacientes com baixos títulos de anticorpos. O esperado seria um aumento de MPs de hemácias no grupo de pacientes com altos títulos de anticorpos no concentrado de hemácias, a não ocorrência desse fenômeno em pacientes com altos títulos de anticorpos anti-FVIII em hemácias sugere que

talvez a lise das hemácias esteja associada a anticorpos com menor caráter inibitório, possivelmente IgG1.

As análises dos grupos categorizados quanto aos títulos de inibidores do FVIII demonstraram um aumento de MPs derivadas de células endoteliais, granulócitos e linfócitos T em pacientes com inibidores de alta resposta e uma frequência superior de MPs derivadas de hemácias em pacientes com inibidores de baixa resposta. Esses resultados sugerem que inibidores de alta resposta, principalmente IgG4, também podem contribuir com a ativação do compartimento celular composto por células endoteliais, granulócitos e linfócitos T e conseqüentemente com o microambiente de citocinas propício ao desenvolvimento de inibidores. Já os inibidores de baixa resposta, principalmente IgG1 e IgG2, podem contribuir com a hemólise via sistema do complemento.

A subclasse IgG4 tem sido relacionada à presença de altos títulos de anticorpos inibitórios, enquanto a subclasse IgG1 tem sido relacionada a baixos títulos de inibidores (CHAVES *et al.*, 2010; MONTALVÃO *et al.*, 2015).

As imunoglobulinas da subclasse IgG4 têm sido consideradas como anticorpos não patológicos com propriedades anti-inflamatórias. Em condições fisiológicas, quando comparadas às outras subclasses, a IgG4 é a menos presente com valores entre 0,8 a 11,7% do total de IgG. Além disso, a IgG4 é funcionalmente diferente das outras subclasses de anticorpos IgG por apresentar baixa capacidade de interação com receptores celulares, e portanto, baixa capacidade de ativação do complemento. Ao passo que a subclasse proporcionalmente mais abundante é a IgG1, que compreende entre 43 a 75% das imunoglobulinas do tipo IgG e os anticorpos das subclasses IgG1 e IgG2 são classicamente associados à ativação do complemento e conseqüente lise celular (AALBERSE *et al.*, 2009; RISPENS *et al.*, 2011; VIDARSSON *et al.*, 2014).

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, o FVIII parece ter a capacidade de se ligar à superfície das hemácias e como conseqüência interagir com anticorpos anti-FVIII, sendo a conseqüência da presença desses anticorpos variável de acordo com o tipo de imunoglobulina associada. Foi possível, portanto, identificar a presença de anticorpos anti-FVIII na superfície de hemácias como potenciais biomarcadores fenotípicos humorais associados aos pacientes com inibidores.

Esses resultados preliminares sugerem que a investigação de anticorpos anti-FVIII na superfície de hemácias em pacientes com HA é um importante tema a ser abordado em futuras investigações. Principalmente, pois não é habitual a pesquisa de subclasses de anticorpos anti-FVIII na rotina de pacientes com HA e ainda em função do teste de Bethesda, que é realizado

na rotina de busca de anticorpos inibidores, ser realizado somente em amostras provenientes de plasma.

O presente estudo teve como objetivo final a determinação dos índices de avidéz de anticorpos anti-FVIII em amostras de pacientes com e sem inibidores do FVIII.

Os eventos iniciais da resposta imune ao FVIII que culminam com a produção de anticorpos inibidores requerem a ativação de linfócitos B e sua diferenciação em plasmócitos secretores de anticorpos de baixa afinidade e posteriormente em células B de memória que reconhecerão o FVIII (HU *et al.*, 2007; van HELDEN *et al.*, 2008; ASTERMARK *et al.*, 2015).

As células B de memória específicas ao FVIII têm um importante papel na manutenção e na maior produção de anticorpos anti-FVIII em casos de novas exposições. Quando há reexposição ao FVIII, células B de memória são rapidamente reestimuladas a se proliferarem e se diferenciarem em plasmócitos, que por sua vez serão capazes de secretar anticorpos de alta afinidade (ORACKI *et al.*, 2010; ASTERMARK *et al.*, 2015).

Os anticorpos relatados como tendo baixa afinidade têm a capacidade de se associarem e se dissociarem rapidamente aos antígenos. Por outro lado, os anticorpos relatados como tendo alta afinidade têm a capacidade de se manterem associados aos antígenos por um período prolongado. No entanto, o conceito de afinidade dado aos anticorpos não reflete a real força de interação entre os anticorpos e os antígenos, pois a afinidade é um conceito que se refere à força de interação, em termos termodinâmicos, entre um antígeno e uma região específica de um anticorpo. O conceito de avidéz ou afinidade funcional, por sua vez, se refere à força de interação entre anticorpos e antígenos complexos, dependendo de sua afinidade, valência e interação estrutural (RUDNICK & ADAMS, 2009; HOFBAUER *et al.*, 2015; JACQUEMIN & PEERLINCK, 2015).

Em função do exposto, o estudo da avidéz dos anticorpos é a forma ideal para mensurar a capacidade de interação entre anticorpos e antígenos em sistemas biológicos (RUDNICK & ADAMS, 2009).

A avaliação dos índices de avidéz demonstrou que pacientes com HA classificados como moderados e graves apresentaram uma maior avidéz de anticorpos IgG total e IgG1 anti-FVIII e uma menor avidéz de anticorpos IgG4 anti-FVIII. Foi observada ainda uma maior avidéz de anticorpos IgG4 anti-FVIII em pacientes classificados como moderados quando comparados aos pacientes classificados como graves. O índice de avidéz de IgG4 correlacionou-se, portanto, com a gravidade da HA e ainda com os títulos de inibidores.

Tem sido estabelecido na literatura que a avidéz de anticorpos do tipo IgG diminuem

significativamente ao longo do tempo em diversas condições avaliadas, provavelmente em função da maturação dos anticorpos variar de acordo com a concentração dos antígenos e das condições de exposição (VERMONT *et al.*, 2002; BARKOFF *et al.*, 2012; PRELOG *et al.*, 2013). Como os pacientes estudados neste trabalho interrompem o tratamento com o FVIII após apresentarem inibidores do FVIII, as condições de concentração de antígenos sofre uma brusca alteração, o que pode favorecer o surgimento de anticorpos com uma menor avidéz, como observado pelo resultado da avidéz de IgG4.

Pouca atenção é dada à avaliação de avidéz de anticorpos anti-FVIII em pacientes com hemofilia A e somente um estudo foi publicado a esse respeito. Chargelegue e colaboradores (1993) avaliaram a avidéz de anticorpos do tipo IgG em pacientes com HA infectados pelo vírus HIV e observaram que a resposta imune desses pacientes foi restrita às subclasses IgG1 e IgG4 e que a avidéz de IgG1 foi superior a avidéz de IgG4, corroborando com os resultados de determinação da avidéz (CHARGELEGUE *et al.*, 1993).

Suwannalai e colaboradores (2014) descreveram que anticorpos com baixa avidéz estariam associados com altas taxas de destruição de articulações em pacientes com artrite reumatoide, revelando que anticorpos com baixa avidéz podem exibir um potencial de interagir com mais antígenos ao mesmo tempo, sugerindo que esses anticorpos podem ter uma melhor biodisponibilidade, permitindo ainda, relacionar anticorpos de baixa avidéz à gravidade da doença e indicar que esses anticorpos podem ter um importante impacto biológico (SUWANNALAI *et al.*, 2014). Assim como observado na correlação entre os anticorpos da subclasse IgG4 anti-FVIII e a gravidade dos pacientes, demonstrando que anticorpos de baixa avidéz podem mediar efeitos biológicos mais pronunciados em pacientes com inibidores.

Em uma recente publicação, Hofbauer e colaboradores (2015) descreveram a afinidade de anticorpos anti-FVIII e demonstraram uma interessante associação entre a afinidade dos anticorpos e o desenvolvimento de inibidores. Foi demonstrado que os anticorpos anti-FVIII detectados em pacientes com inibidores têm uma força de afinidade até 100 vezes maior que anticorpos observados em pacientes sem inibidores. Foi observada também uma menor afinidade de anticorpos da subclasse IgG1 anti-FVIII quando comparados a anticorpos da subclasse IgG4 anti-FVIII (HOFBAUER *et al.*, 2015).

Relacionando os dados obtidos por Hofbauer e colaboradores (2015) com os dados de determinação de avidéz, pode-se especular que a menor afinidade de anticorpos da subclasse IgG1 anti-FVIII possa ser compensada pela avidéz superior dos anticorpos IgG1 anti-FVIII, visto que a avidéz dos anticorpos pode ser alterada quando um antígeno com múltiplas regiões

de ligação interage com os anticorpos, sugerindo que em alguns casos a avidéz dos anticorpos possa ser inversa à afinidade dos mesmos.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, anticorpos anti-FVIII de alta avidéz podem ser associados a anticorpos com menor capacidade de neutralização enquanto anticorpos de baixa avidéz podem ser associados a anticorpos com maior capacidade de neutralização. Sugere-se que as diferentes cinéticas de inibição exibidas pelos anticorpos anti-FVIII podem também ser associadas à avidéz da interação entre o FVIII e os anticorpos, indicando que a avidéz dos anticorpos anti-FVIII pode ser um biomarcador sorológico adicional no desenvolvimento dos inibidores na HA.

No contexto da avaliação da resposta imune contra o FVIII, os biomarcadores fenotípicos celulares e humorais descritos nesse estudo representam um aspecto relevante associado ao desenvolvimento de inibidores, no entanto outros fatores de risco como histórico familiar, etnia, idade do paciente no momento da primeira exposição ao FVIII, tipo de mutação no gene do FVIII, mutações e ou alterações em outros componentes do sistema imune e tipo, frequência e tipo do FVIII infundido não podem ser negligenciados (GHOSH & SHETY, 2009; LACROIX-DESMAZES *et al.*, 2008; AGOSTINI *et al.*, 2012; ASTERMARK *et al.*, 2013; COLLINS *et al.*, 2014; ASTERMARK, 2015).

Com base nos dados obtidos, acredita-se que um microambiente composto de citocinas anti-inflamatórias/reguladoras secretadas por monócitos, neutrófilos, células T e linfócitos B favoreçam a síntese de anticorpos anti-FVIII com atividade inibitória (predominantemente IgG4). Já um microambiente composto de citocinas pró-inflamatórias favoreça a síntese de anticorpos anti-FVIII com menor atividade inibitória (IgG1).

Observou-se também um aumento na presença de micropartículas circulantes derivadas de células endoteliais, granulócitos e linfócitos T em pacientes sem histórico de formação de inibidores, provavelmente proporcionado pelo aumento da ativação dos leucócitos e do microambiente pró-inflamatório observado nesses pacientes. Entretanto, observou-se um aumento na presença de MPs derivadas de hemácias em pacientes com inibidores, possivelmente devido à presença de anticorpos IgG anti-FVIII em hemácias. Associaram-se ainda os níveis de micropartículas aos títulos de anticorpos anti-FVIII com caráter inibitório.

Verificou-se ainda uma avidéz superior de anticorpos anti-FVIII (IgG total e IgG1) e uma menor avidéz de anticorpos anti-FVIII (IgG4) e sua associação com a gravidade da HA e com a presença de inibidores, demonstrando que existem variações de avidéz dos anticorpos anti-FVIII importantes dependendo do perfil dos pacientes com HA.

Sendo assim, considera-se que a avaliação do perfil de citocinas produzidas pela resposta imune, a determinação de MPs, a detecção de anticorpos anti-FVIII em hemácias e a determinação da avidéz de anticorpos anti-FVIII em pacientes com HA podem ser importantes biomarcadores fenotípicos celulares e humorais para o monitoramento do desenvolvimento de anticorpos inibidores ao FVIII.

AALBERSE, R. C.; STAPEL, S. O.; SCHUURMAN, J.; RISPENS, T. Immunoglobulin G4: an odd antibody. **Clinical & Experimental Allergy**, v.39(4), p.469-77, 2009.

AGOSTINI, D.; ROSSET, C.; BOTTON, M. R.; KAPPEL, D. B.; VIEIRA, I. A.; GORZIZA, R. P.; SALZANO, F. M.; BANDINELLI, E. Immune system polymorphisms and factor VIII inhibitor formation in Brazilian haemophilia A severe patients. **Haemophilia**, v.18(6), p.e416-8, 2012.

ALEDORT, L. M.; HASCHEMEYER, R. H.; PETTERSSON, H. A longitudinal study of orthopaedic outcomes for severe factor VIII deficient haemophiliacs. The Orthopaedic Outcome Study Group. **Journal of Internal Medicine**, v.236, p.391-9, 1994.

ANTONARAKIS, S. E.; ROSSITER, J. P.; YOUNG, M.; HORST, J.; DE MOERLOOSE, P.; SOMMER, S.S.; KETTERLING, R.P.; KAZAZIAN, H.H.; NÉGRIER, C.; VINCIGUERRA, C.; et al. Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study. **Blood**. v.86, p.2206-2212, 1995.

ASTERMARK, J. FVIII inhibitors: pathogenesis and avoidance. **Blood**, v.125(13), p.2045-51, 2015.

ASTERMARK, J., OLDENBURG, J., CARLSON, J., PAVLOVA, A., KAVAKLI, K., BERNTORP, E.; LEFVERT, A.K. Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. **Blood**, v.108, p.3739-45, 2006a.

ASTERMARK, J.; DONFIELD, S. M.; DIMICHELE, D. M.; GRINGERI, A.; GILBERT, S. A.; WATERS, J.; BERNTORP, E. A. randomized comparison of bypassing agents in hemophilia complicated by an inhibitor: the FEIBA NovoSeven Comparative (FENOC) Study. **Blood**, v.109, p.546-51, 2007.

ASTERMARK, J.; DONFIELD, S. M.; GOMPERS, E. D.; SCHWARZ, J.; MENIUS, E. D.; PAVLOVA, A.; OLDENBURG, J.; KESSING, B.; DIMICHELE, D. M.; SHAPIRO, A. D.; WINKLER, C. A.; BERNTORP, E.; HEMOPHILIA INHIBITOR GENETICS STUDY (HIGS) COMBINED COHORT. The polygenic nature of inhibitors in hemophilia A: results from the Hemophilia Inhibitor Genetics Study (HIGS) Combined Cohort. **Blood**, v.121(8), p.1446-54, 2013.

ASTERMARK, J.; OLDENBURG, J.; PAVLOVA, A.; BERNTORP, E.; LEFVERT, A. K.; MIBS STUDY GROUP. Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. **Blood**, v.107, p.3167-3172, 2006b.

ATHALE, A. H.; MARCUCCI, M.; IORIO, A. Immune tolerance induction for treating inhibitors in people with congenital haemophilia A or B. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.24, CD010561, 2014.

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

BARROW, R. T.; HEALEY, J. F.; JACQUEMIN, M. G.; SAINT-REMY, J. M.; LOLLAR, P. Antigenicity of putative phospholipid membrane-binding residues in factor VIII. **Blood**, v.97, p.169-74, 2001.

BAYRY, J.; LACROIX-DESMAZES, S.; PASHOV, A.; STAHL, D.; HOEBEKE, J.; KAZATCHKINE, M. D.; KAVERI, S. V. Autoantibodies to factor VIII with catalytic activity. **Autoimmunity Reviews**, v.2, p.30-5, 2003.

BERCKMANS, R. J.; NEIUWLAND, R.; BOING, A. N.; ROMIJN, F. P.; HACK, C. E.; STURK, A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. **Thrombosis and Haemostasis**, v.85, p.639-46, 2001.

BERNTORP, E.; ASTERMARK, J.; BJÖRKMAN, S.; BLANCHETTE, V. S.; FISCHER, K.; GIANGRANDE, P. L.; GRINGERI, A.; LJUNG, R. C.; MANCO-JOHNSON, M. J.; MORFINI, M.; KILCOYNE, R. F.; PETRINI, P.; RODRIGUEZ-MERCHAN, E. C.; SCHRAMM, W.; SHAPIRO, A.; VAN DEN BERG, H. M.; HART, C. Consensus perspectives on prophylactic therapy for haemophilia: summary statement. **Haemophilia**, v.9(1), p.1-4, 2003.

BLANCHETTE, V. S.; O'MAHONY, B.; MCJAMES, L.; MAHLANGU, J. N. Assessment of outcomes. **Haemophilia**, v.20(4), p.114-20, 2014.

BOVENSCHEN, N.; RIJKEN, D. C.; HAVEKES, L. M.; VAN VLIJMEN, B. J. M.; MERTENS, K. The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.3, p.1257-65, 2005.

BRAUN, N.; BOSCH, T. Immunoabsorption, current status and future developments. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v.9, p.2017-38, 2000.

BRIÈRE, F.; SERVET-DELPRAT, C.; BRIDON, J. M.; SAINT-REMY, J. M.; BANCHEREAU, J. Human interleukin 10 induces naive surface immunoglobulin D+ (sIgD) B cells to secrete IgG1 and IgG3. **The Journal of Experimental Medicine**, v.179, p.757-62, 1994.

BROZE, G. J. JR. Tissue factor pathway inhibitor and the current concept of blood coagulation. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, v.6(1), p.S7-13, 1995.

CAMPOS, F. M. F.; FRANKLIN, B. S.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; FILHO, A. L. S.; DE PAULA, S. C. O.; FONTES, C. J.; BRITO, C. F.; CARVALHO, L. H. Augmented plasma microparticles during acute Plasmodium vivax infection. **Malaria Journal**, V.9, P.327, 2010.

CAO, O.; LODUCA, P. A.; HERZOG, R. W. Role of regulatory T cells in tolerance to coagulation factors. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.7(1), p.88-91, 2009.

CHARGELEGUE, D.; O'TOOLE, C. M.; COLVIN, B. T. A longitudinal study of the IgG antibody response to HIV-1 p17 gag protein in HIV-1 + patients with haemophilia: titre and avidity. **Clinical & Experimental Immunology**, v.93, p.331-6, 1993.

CHAVES, D. G.; VELLOSO-RODRIGUES, C.; MOREAU, V.; NGUYEN, C.; VILLARD, S.; BELISÁRIO, A. R.; GRANIER, C.; SANTORO, M. M. Reactivity profile of anti-factor VIII antibodies with designed synthetic peptides mimicking epitopes of the C2 and a1 domains. **British Journal of Haematology**, v.141, p.708-15, 2008.

CHAVES, D. G.; VELLOSO-RODRIGUES, C.; OLIVEIRA, C. A.; SANTORO, M. M.; MARTINS-FILHO, O. A. A shift towards a T cell cytokine deficiency along with an anti-inflammatory/regulatory microenvironment may enable the synthesis of anti-FVIII

inhibitors in haemophilia A patients. **Clinical and Experimental Immunology**, v.162, p.425-37, 2010.

CHIRONI, G. N.; BOULANGER, C. M.; SIMON, A.; DIGNAT-GEORGE, F.; FREYSSINET, J.M.; TEDGUI, A. Endothelial microparticles in diseases. **Cell and Tissue Research**, v.335, p.143-51, 2009.

COLLINS, P. W.; PALMER, B. P.; CHALMERS, E. A.; HART, D. P.; LIESNER, R.; RANGARAJAN, S.; TALKS, K.; WILLIAMS, M.; HAY, C. R.; UK HAEMOPHILIA CENTRE DOCTORS' ORGANIZATION. Factor VIII brand and the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated UK children with severe hemophilia A, 2000-2011. **Blood**, v.124(23), p.3389-97, 2014.

COMBES, V.; SIMON, A. C.; GRAU, G. E.; ARNOUX, D.; CAMOIN, L.; SABATIER, F.; MUTIN, M.; SANMARCO, M.; SAMPOL, J.; DIGNAT-GEORGE, F. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. **The Journal of Clinical Investigation**, v.104, p.93-102, 1999.

COUPER, K. N.; BARNES, T.; HAFALLA, J. C. R.; COMBES, V.; RYFFEL, B.; SECHER, T.; GRAU, G. E.; RILEY, E. M.; DE SOUZA, J. B. Parasite-Derived Plasma Microparticles Contribute Significantly to Malaria Infection-Induced Inflammation through Potent Macrophage Stimulation. **PLOS Pathogens**, v.6, p.e1000744, 2010.

DASGUPTA, S.; REPESSÉ, Y.; BAYRY, J.; NAVARRETE, A. M.; WOOTLA, B.; DELIGNAT, S.; IRINOPOULOU, T.; KAMATÉ, C.; SAINT-REMY, J. M.; JACQUEMIN, M.; LENTING, P. J.; BOREL-DERLON, A.; KAVERI, S. V.; LACROIX-DESMAZES, S. VWF protects FVIII from endocytosis by dendritic cells and subsequent presentation to immune effectors. **Blood**, v.109(2), p.610-2, 2007.

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

DE BACK, D.; KOSTOVA, E.B.; VAN KRAAIJ, M.; VAN DEN BERG, T.K.; VAN BRUGGEN, R. Of macrophages and red blood cells; a complex love story. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 1-11, 2014.

DIANZANI, U.; PILERI, A.; BIANCHI, A.; CAMPONI, A.; TAMPONI, G.; MASSAIA, M. Biochemical and immunologic abnormalities in peripheral blood T lymphocytes of patients with hemophilia A. **European Journal of Haematology**, v.41(4), p.334-40, 1988.

DIETRICH, S. L.; MOSLEY, J. W.; LUSHER, J. M.; HILGARTNER, M. W.; OPERSKALSKI, E. A.; HABEL, L.; ALEDORT, L. M.; GJERSET, G. F.; KOERPER, M. A.; LEWIS, B. H.; PEGELOW, C. H.; THE TRANSFUSION SAFETY STUDY GROUP. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 by dry-heated clotting factor concentrates. **Vox Sanguinis**, v.59(3), p.129-35, 1990.

DIGNAT-GEORGE, F.; BOULANGER, C. M. The many faces of endothelial microparticles. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.31, p.27-33, 2011.

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

DISTLER, J. H.; HUBER, L. C.; GAY, S.; DISTLER, O.; PISETSKY, D. S. Microparticles as mediators of cellular cross-talk in inflammatory disease. **Autoimmunity**, v.39, p.683-90, 2006.

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

ENDHARTI, A. T.; RIFA, I. M.; SHI, Z.; FUKUOKA, Y.; NAKAHARA, Y.; KAWAMOTO, Y.; TAKEDA, K.; ISOBE, K.; SUZUKI, H. Cutting edge: CD8CD122 regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN production and proliferation of CD8 T cells. **The Journal of Immunology**, v.175, p.7093-7, 2005.

ENJETI, A. K.; SELDON, M. Microparticles: role in haemostasis and venous thromboembolism. **In Tech**, v.1, p.1-16, 2012.

EVATT, B. L.; AUSTIN, H.; LEON, G.; RUIZ-SÁEZ, A.; DE BOSCH, N. Haemophilia therapy: assessing the cumulative risk of HIV exposure by cryoprecipitate. **Haemophilia**, v.5(5), p.295-300, 1999.

FAILLE, D.; COMBES, V.; MITCHELL, A.; FONTAINE, A.; JUHAN-VAGUE, I.; ALESSI, M.; CHIMINI, G.; FUSAI, T.; GRAU, G. E. Platelet microparticles: a new player in malaria parasite cytoadherence to human brain endothelium. **The FASEB Journal**, v.23, p.3449-58, 2009.

FAY, P. J.; COUMANS, J. V.; WALKER, F. J. von Willebrand factor mediates protection of factor VIII from activated protein C-catalyzed inactivation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.266(4), p.2172-7, 1991.

FERREIRA, C. N.; SOUSA, M. O.; DUSSE, L. M. S.; CARVALHO, M. G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.32(5), p.416-21, 2010.

FISCHER, K.; STEEN CARLSSON, K.; PETRINI, P.; HOLMSTRÖM, M.; LJUNG, R.; VAN DEN BERG, H. M.; BERNTORP, E. Intermediate-dose versus high-dose prophylaxis for severe hemophilia: comparing outcome and costs since the 1970s. **Blood**, v.122(7), p.1129-36, 2013.

FLAUMENHAFT, R.; DILKS, J. R.; RICHARDSON, J.; ALDEN, E.; PATEL-HETT, S. R.; BATTINELLI, E.; KLEMENT, G. L.; SOLA-VISNER, M.; ITALIANO, J. E. JR. Megakaryocyte derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. **Blood**, V.113, P.1112-21, 2009.

FREYSSINET, J. M. Cellular microparticles: what are they bad or good for? **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.1, p.1655-62, 2003.

GHOSH, K.; SHETY, S. Immune response to FVIII in hemophilia A: an overview of risk factors. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v.37(2), p.58-66, 2009.

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

GOODEVE, A. C.; PEAKE, I. R. The molecular basis of hemophilia A: genotype-phenotype relationships and inhibitor development. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v.29(1), p.23-30, 2003.

GOUW, S. C.; VAN DEN BERG, H. M.; FISCHER, K.; AUERSWALD, G.; CARCAO, M.; CHALMERS, E.; CHAMBOST, H.; KURNIK, K.; LIESNER, R.; PETRINI, P.; PLATOKOUKI, H.; ALTISENT, C.; OLDENBURG, J.; NOLAN, B.; GARRIDO, R. P.; MANCUSO, M. E.; RAFOWICZ, A.; WILLIAMS, M.; CLAUSEN, N.; MIDDELBURG, R. A.; LJUNG, R.; VAN DER BOM, J. G.; PEDNET AND RESEARCH OF DETERMINANTS OF INHIBITOR DEVELOPMENT (RODIN) STUDY GROUP. Intensity of factor VIII treatment and inhibitor development in children with severe hemophilia A: the RODIN study. **Blood**, v.121(20), p.4046-55, 2013.

HATANAKA, E.; MONTEAGUDO, P. T.; MARROCOS, M. S.; CAMPA, A. Neutrophils and monocytes as potentially important sources of proinflammatory cytokines in diabetes. **Clinical & Experimental Immunology**, v.146(3), p.443-7, 2006.

HAY, C. R.; DIMICHELE, D. M. The principal results of the International Immune Tolerance Study: a randomized dose comparison. **Blood**, v.119(6), p.1335-44, 2012.

HERNDON, J. M.; STUART, P. M.; FERGUSON, T. A. Peripheral deletion of antigen-specific T cells leads to long-term tolerance mediated by CD8 cytotoxic cells. **The Journal of Immunology**, v.174, p.4098-104, 2005.

HOFBAUER, C. J.; WHELAN, S. F.; HIRSCHLER, M.; ALLACHER, P.; HORLING, F. M.; LAWO, J. P.; OLDENBURG, J.; TIEDE, A.; MALE, C.; WINDYGA, J.; GREINACHER, A.; KNÖBL, P. N.; SCHRENK, G.; KOEHN, J.; SCHEIFLINGER, F.; REIPERT, B. M. Affinity of FVIII-specific antibodies reveals major differences between neutralizing and nonneutralizing antibodies in humans. **Blood**, v.125, p.1180-8, 2015.

HOFFMAN, M. Remodeling the blood coagulation cascade. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v.16, p.17-20, 2003.

HOFFMAN, M.; MONROE, D. M. A cell-based model of hemostasis. **Thrombosis and Haemostasis**, v.85(6), p.958-65, 2001.

HOYER, L. W. Hemophilia A. **New England Journal of Medicine**, v.330, p.38-47, 1994.

HU, G.; GUO, D.; KEY, N. S.; CONTI-FINE, B. M. Cytokine production by CD4+ T cells specific for coagulation factor VIII in healthy subjects and haemophilia A patients. **Thrombosis and Haemostasis**, v.97, p.788-94, 2007.

JACQUEMIN, M.; PEERLINCK, K. Factor VIII inhibitor: affinity is the clue. **Blood**, v.125, p.1056-8, 2015.

KANE, W. H.; DAVIE, E. W. Cloning of a cDNA coding for human factor V, a blood coagulation factor homologous to factor VIII and ceruloplasmin. **National Academy of Sciences of the United States of America**, v.83, p.6800-4, 1986.

KASAMA, T.; MIWA, Y.; ISOZAKI, T.; ODAI, T.; ADACHI, M.; KUNKEL, S. L. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. **Current Drug Targets - Inflammation & Allergy**, v.4(3), p.273-9, 2005.

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

KRONER, B. L.; ROSENBERG, P. S.; ALEDORT, L. M.; ALVORD, W. G.; GOEDERT, J. J. HIV-1 infection incidence among persons with hemophilia in the United States and western Europe, 1978-1990. Multicenter Hemophilia Cohort Study. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v.7(3), p.279-86, 1994.

LACROIX-DESMAZES, S.; KAZATCHKINE, M. D.; KAVERI, S. V. Catalytic antibodies to factor VIII in haemophilia A. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, v.14(1), p.S31-4, 2003.

LACROIX-DESMAZES, S.; MISRA, N.; BAYRY, J.; VILLARD, S.; KAZATCHKINE, M. D.; KAVERI, S. V. Antibodies with hydrolytic activity towards factor VIII in patients with hemophilia A. **Journal of Immunological Methods**, v.269(1-2), p.251-6, 2002.

LACROIX-DESMAZES, S.; NAVARRETE, A. M.; ANDRÉ, S.; BAYRY, J.; KAVERI, S. V.; DASGUPTA, S. Dynamics of factor VIII interactions determine its immunologic fate in hemophilia A. **Blood**, v.112(2), p.240-9, 2008.

LAURIAN, Y.; GIRMA, J. P.; ALLAIN, J. P.; VERROUST, F.; LARRIEU, M. J. Absence of anamnestic response after transfusion of washed red blood cells in haemophilia A patients with antibody to factor VIII. **Scandinavian Journal of Haematology**, v.28, p.223-37, 1982.

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

LE GAL, F. A.; RITEAU, B.; SEDLIK, C.; KHALIL-DAHER, I.; MENIER, C.; DAUSSET, J.; GUILLET, J. G.; CAROSELLA, E. D.; ROUAS-FREISS, N. HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. **International Immunology**, v.11(8), p.1351-6, 1999.

LENTING, P. J.; VAN MOURIK, J. A.; MERTENS, K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. **Blood**, v.92, p.3983-96, 1998.

LEROYER, A. S.; ISOBE, H.; LESÈCHE, G.; CASTIER, Y.; WASSEF, M.; MALLAT, Z.; BINDER, B. R.; TEDQUI, A.; BOULANGER, C. M. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. **Journal of the American College of Cardiology**, v.49, p.772-7, 2007.

LEVINSON, B.; BERMINGHAM, JR.; METZENBERG, A.; KENWRICK, S.; CHAPMAN, V.; GITSCHIER, J. Sequence of the human factor VIII-associated gene is conserved in mouse. **Genomics**, v.13, p.862-5, 1992.

LOLLAR, P. Pathogenic antibodies to coagulation factors. Part one: factor VIII and factor IX. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.2, p.1082-95, 2004.

LOLLAR, P.; KNUTSON, G. J.; FASS, D. N. Activation of porcine factor VIII:C by thrombin and factor Xa. **Biochemistry**, v.24, p.8056-64, 1985.

LUCK, J. V. JR.; SILVA, M.; RODRIGUEZ-MERCHAN, E. C.; GHALAMBOR, N.; ZAHIRI, C. A.; FINN, R. S. Hemophilic arthropathy. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v.12, p.234-45, 2004.

LUSHER, J. M.; ARKIN, S.; ABILDGAARD, C. F.; SCHWARTZ, R. S. Recombinant factor VIII for the treatment of previously untreated patients with hemophilia A. Safety, efficacy, and development of inhibitors. Kogenate Previously Untreated Patient Study Group. **The New England Journal of Medicine**, v.328(7), p.453-9, 1993.

MACFARLANE, R. G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. **Nature**. v.202, p.498-9, 1964.

MATSUTANI, T.; SAKURAI, Y.; YOSHIOKA, T.; TSURUTA, Y.; SUZUKI, R.; SHIMA, M.; YOSHIOKA, A. Replacement therapy with plasma-derived factor VIII concentrates induces skew in T-cell receptor usage and clonal expansion of CD8+ T-cell in HIV-seronegative hemophilia patients. **Thrombosis and Haemostasis**, v.90, p.279-92, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados. **Perfil das coagulopatias hereditárias no Brasil: 2014 / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 62 p.**

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. **Manual de tratamento das coagulopatias hereditárias / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 76 p.**

MOBARREZ, F.; MIKOVIC, D.; ANTOVIC, A.; ANTOVIC, J. P. Is decrease of microparticles related to improvement of hemostasis after FVIII injection in haemophilia A patients treated on demand? **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.11, p.697-703, 2012.

MONTALVÃO, S. A.; TUCUNDUVA, A. C.; SIQUEIRA, L. H.; SAMBO, A. L.; MEDINA, S. S.; OZELO, M. C. A longitudinal evaluation of anti-FVIII antibodies demonstrated IgG4 subclass is mainly correlated with high-titre inhibitor in haemophilia A patients. **Haemophilia**, v.21(5), p.686-92, 2015.

MOREAU, A.; LACROIX-DESMAZES, S.; STIELTJES, N.; SAENKO, E.; KAVERI, S. V.; D'OIRON, R.; SULTAN, Y.; SCANDELLA, D.; KAZATCHKINE, M. D. Antibodies to the FVIII light chain that neutralize FVIII procoagulant activity are present in plasma of nonresponder patients with severe hemophilia A and in normal polyclonal human IgG. **Blood**, v.95(11), p.3435-41, 2000.

MOREL, O.; TOTI, F.; HUGEL, B.; BAKOUBOULA, B.; CAMOIN-JAU, L.; DIGNAT-GEORGE, F.; FREYSSINET, J. M. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.26, p.2594-604, 2006.

MOREL, O.; TOTI, F.; MOREL, N.; FREYSSINET, J. M. Microparticles in endothelial cell and vascular homeostasis: are they really noxious? **Haematologica**, v.94, p.313-7, 2009.

MURPHY, K.M. T lymphocyte differentiation in the periphery. **Current Opinion in Immunology**, v.10, p.226-32, 1998.

OLIVEIRA, C. A.; VELLOSO-RODRIGUES, C.; MACHADO, F. C.; CARVALHO, B. N.; GENTZ, S. H.; MARTINS-FILHO, O. A.; CHAVES, D. G. Cytokine profile and FVIII inhibitors development in haemophilia A. **Haemophilia**, v.19(3), p.139-42, 2013.

ORACKI, S. A.; WALKER, J. A.; HIBBS, M. L.; CORCORAN, L. M.; TARLINTON, D. M. Plasma cell development and survival. **Immunological Reviews**, v.237(1), p.140-59, 2010.

OWENS, A. P.; MACKMAN, N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. **Circulation Research**, v.108, p.1284-97, 2011.

PATEK, A. J. J.; TAYLOR, F. H. L. Hemophilia. Some properties of a substance obtained from normal human plasma effective in accelerating the coagulation of hemophilic blood. **The Journal of Clinical Investigation**, v.16, p.113, 1937.

PIMENTEL, J. P.; CHAVES, D. G.; ARAÚJO, A. R.; DE ARAÚJO, E. M.; DA SILVA FRAPORTI, L.; NEVES, W. L.; TARRAGÔ, A. M.; TORRES, K. L.; GENTZ, S. H.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; MALHEIRO, A. Anti-inflammatory/regulatory cytokine microenvironment mediated by IL-4 and IL-10 coordinates the immune response in hemophilia A patients infected chronically with hepatitis C virus. **Journal of Medical Virology**, v.85(6), p.1009-18, 2013.

PORDES, A. G.; BAUMGARTNER, C. K.; ALLACHER, P.; AHMAD, R. U.; WEILLER, M.; SCHIVIZ, A. N.; SCHWARZ, H. P.; REIPERT, B. M. T cell-independent restimulation of FVIII-specific murine memory B cells is facilitated by dendritic cells together with toll-like receptor 7 agonist. **Blood**, v.118(11), p.3154-62, 2011.

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

PRESCOTT, R.; NAKAI, H.; SAENKO, E. L.; SCHARRER, I.; NILSSON, I. M.; HUMPHRIES, J. E.; HURST, D.; BRAY, G.; SCANDELLA, D. The inhibitor antibody response is more complex in hemophilia A patients than in most nonhemophiliacs with factor VIII autoantibodies. Recombinate and Kogenate Study Groups. **Blood**, v.89(10), p.3663-71, 1997.

PROULLE, V.; HUGEL, B.; GUILLET, B.; GRUNEBAUM, L.; LAMBERT, T.; FREYSSINET, J.M.; DREYFUS, M. Circulating microparticles are elevated in haemophiliacs and non-haemophilic individuals aged. **British Journal of Haematology**, v.131, p.487-9, 2005.

PROULLE, V.; HUGEL, B.; GUILLET, B.; TRICHET, C.; RAFOWICZ, A.; LAMBERT, T.; FREYSSINET, J. M.; DREYFUS, M. Injection of recombinant activated factor VII can induce transient increase in circulating procoagulant microparticles. **Thrombosis and Haemostasis**, v.91, p.873-8, 2004.

- REDING, M. T.; LEI, S.; LEI, H.; GREEN, D.; GILL, J.; CONTI-FINE, B. M. Distribution of Th1- and Th2-induced anti-factor VIII IgG subclasses in congenital and acquired hemophilia patients. **Thrombosis and Haemostasis**, v.88, p.568-75, 2002.
- REDING, M. T.; OKITA, D. K.; DIETHELM-OKITA, B. M.; ANDERSON, T. A.; CONTI-FINE, B. M. Human CD4+ T-cell epitope repertoire on the C2 domain of coagulation factor VIII. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.1, p.1777-84, 2003.
- RICK, M. E.; WALSH, C. E.; KEY, N. S. Congenital bleeding disorders. **Hematology - American Society of Hematology Educational Program**, p.559-74, 2003.
- RISPENS, T.; OOIJEVAAR-DE HEER, P.; BENDE, O.; AALBERSE, R. C. Mechanism of immunoglobulin G4 Fab-arm exchange. **Journal of the American Chemical Society**, v.133(26), p.10302-11, 2011.
- ROCINO, A.; SANTAGOSTINO, E.; MANCUSO, M. E.; MANNUCCI, P. M. Immune tolerance induction with recombinant factor VIII in hemophilia A patients with high responding inhibitors. **Haematologica**, v.91(4), p.558-61, 2006.
- ROSADO, S.; RUA-FIGUEROA, I.; VARGAS, J. A.; GARCIA-LAORDEN, M. I.; LOSADA-FERNANDEZ, I.; MARTIN-DONAIRE, T.; PEREZ-CHACON, G.; RODRIGUEZ-GALLEGO, C.; NARANJO-HERNANDEZ, A.; OJEDA-BRUNO, S.; CITORES, M. J.; PEREZ-ACIEGO, P. Interleukin-10 promoter polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus from the Canary Islands. **International Journal of Immunogenetics**, v.35, p.235-42, 2008.
- ROSNER, F. Hemophilia in the talmud and rabbinic writings. **Annals of Internal Medicine**, v.70(4), p.833-7, 1969.
- ROUSSET, F.; GARCIA, E.; DEFRANCE, T.; PÉRONNE, C.; VEZZIO, N.; HSU, D. H.; KASTELEINI, R.; MOORE, K. W.; BANCHEREAU, J. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.89(5), p.1890-3, 1992.
- RUDNICK, S. I.; ADAMS, G. P. Affinity and avidity in antibody-based tumor targeting. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v.24, p.155-61, 2009.
- SAKURAI, Y.; MATSUTANI, T.; YOSHIOKA, T.; TAKEDA, T.; YOSHIOKA, A.; SHIMA, M. Alterations of T cell receptor V β repertoire of CD8 T lymphocytes in immune tolerance induction in two hemophilia A patients with inhibitors. **VOJNOSANIT PREGLED: Military Medical and Pharmaceutical Journal of Serbia**, v.68(12), p.1047-50, 2011.
- SCOTT, D. W. Inhibitors - cellular aspects and novel approaches for tolerance. **Haemophilia**, v.20(4), p.80-6, 2014.
- SCOTT, D. W.; PRATT, K. P.; MIAO, C. H. Progress toward inducing immunologic tolerance to factor VIII. **Blood**, v.121(22), p.4449-56, 2013.
- SEDER, R. A.; PAUL, W. E. Acquisition of lymphokine-producing phenotype CD4+ T cells. **Annual Review of Immunology**, v.12, p.635-73, 1994.

SHI, Z.; OKUNO, Y.; RIFA'I, M.; ENDHARTI, A. T.; AKANE, K.; ISOBE, K.; SUZUKI, H. Human CD8CXCR3 T cells have the same function as murine CD8CD122 Treg. **European Journal of Immunology**, v.39, p.2106-19, 2009.

SUWANNALAI, P.; BRITSEMMEER, K.; KNEVEL, R.; SCHERER, H. U.; LEVARHT, E. W.; VAN DER HELM-VAN MIL, A. H.; VAN SCHAARDENBURG, D.; HUIZINGA, T. W.; TOES, R. E.; TROUW, L. A. Low-avidity anticitrullinated protein antibodies (ACPA) are associated with a higher rate of joint destruction in rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.73, p.270-6, 2014.

THUSHARA, R. M.; HEMSHEKHAR, M.; BASAPPA, K.; RANGAPPA, K. S.; GIRISH, K. S. Biologicals, platelet apoptosis and human diseases: An outlook. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.93, p.149-58, 2015.

TOOLE, J. J.; KNOPF, J. L.; WOZNEY, J. M.; SULTZMAN, L. A.; BUECKER, J. L.; PITTMAN, D. D.; KAUFMAN, R. J.; BROWN, E.; SHOEMAKER, C.; ORR, E. C. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihaemophilic factor. **Nature**, v.312, p.342-7, 1984.

TRAORE, A. N.; CHAN, A. K.; WEBERT, K. E.; HEDDLE, N.; RITCHIE, B.; ST-LOUIS, J.; TEITEL, J.; LILICRAP, D.; IORIO, A.; WALKER, I. First analysis of 10-year trends in national factor concentrates usage in haemophilia: data from CHARMS, the Canadian Hemophilia Assessment and Resource Management System. **Haemophilia**, v.20(4), p.e251-9, 2014.

USZYNSKI, L. The corrective effect of factor VIII-coated red blood cells in haemophilic plasma with antibodies to factor VIII. **Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica**, v.31, p.12, 1974.

VAN HELDEN, P. M.; VAN DEN BERG, H. M.; GOUW, S. C.; KAIJEN, P. H.; ZUURVELD, M. G.; MAUSER-BUNSCHOTEN, E. P.; AALBERSE, R. C.; VIDARSSON, G.; VOORBERG, J. IgG subclasses of anti-FVIII antibodies during immune tolerance induction in patients with hemophilia A. **British Journal of Haematology**, v.142(4), p.644-52, 2008.

VAN HELDEN, P. M.; VAN HAREN, S. D.; FIJNVANDRAAT, K.; VAN DEN BERG, H. M.; VOORBERG, J. Factor VIII-specific B cell responses in haemophilia A patients with inhibitors. **Haemophilia**, v.16, p.35-43, 2010.

VEHAR, G. A.; KEYT, B.; EATON, D.; RODRIGUEZ, H.; O'BRIEN, D. P.; ROTBLAT, F. OPPERMANN, H.; KECK, R.; WOOD, W. I.; HARKINS, R. N. Structure of human factor VIII. **Nature**, v.312, p.337-42, 1984.

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

VERBRUGGEN, B.; VAN HEERDE, W.; NOVÁKOVÁ, I.; LILICRAP, D.; GILES, A. A 4% solution of bovine serum albumin may be used in place of factor VIII:C deficient plasma in the control sample in the Nijmegen Modification of the Bethesda factor VIII:C inhibitor assay. **Thrombosis and Haemostasis**, v.88, p.362-4, 2002.

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

VIDARSSON, G.; DEKKERS, G.; RISPENS, T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. **Frontiers in Immunology**, v.5, p.520, 2014.

WALTER, J. D.; WERTHER, R. A.; BRISON, C. M.; CRAGERUD, R. K.; HEALEY, J. F.; MEEKS, S. L.; LOLLAR, P.; SPIEGEL, P. C. JR. Structure of the factor VIII C2 domain in a ternary complex with 2 inhibitor antibodies reveals classical and nonclassical epitopes. **Blood**, v.122(26), p.4270-8, 2013.

WHITE, G. C.; ROSENDAAL, F.; ALEDORT, L. M.; LUSHER, J. M.; ROTHSCHILD, C.; INGERSLEV, J. Factor VIII and Factor IX Subcommittee. 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**, v.85(3), p.560, 2001.

WIGHT, J.; PAISLEY, S. The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. **Haemophilia**, v.9(4), p.418-35, 2003.

WOOD, W. I.; CAPON, D. J.; SIMONSEN, C. C.; EATON, D. L.; GITSCHIER, J.; KEYT, B.; SEEBURG, P. H.; SMITH, D. H.; HOLLINGSHEAD, P.; WION, K. L. Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. **Nature**, v.312, p.330-7, 1984.

WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA (WFH). **Report on the Annual Global Survey 2014**. WFH, 2015. 54p.

WRIGHT, H. L.; MOOTS, R. J.; BUCKNALL, R. C.; EDWARDS, R. C. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology**, v.49(9), p.1618-31, 2010.

WROBLEWSKA, A.; REIPERT, B. M.; PRATT, K. P.; VOORBERG, J. Dangerous liaisons: how the immune system deals with factor VIII. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.11, p.47-55, 2013.

ZWAAL, R. F. A.; SCHROIT, A. J. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. **Blood**, v.89, p.1121-32, 1997.

The IL-10 polarized cytokine pattern in innate and adaptive immunity cells contribute to the development of FVIII inhibitors

Amanda CO Silveira^{1*}, Marco AP Santana^{2†}, Isabella G Ribeiro^{1,2†}, Daniel G Chaves^{2†} and Olindo A Martins-Filho^{1†}

Abstract

Background: Hemophilia A (HA) is an X-linked inherited bleeding disorder, resulting from a qualitative or quantitative deficiency of clotting factor VIII (FVIII). Antibodies against FVIII, also called inhibitors, block the procoagulant activity of FVIII; thus, impairing hemostatic activity in patients with HA. The exact mechanism underlying the immunological events behind the development of inhibitors remains unknown. This study aimed to understand immune response to FVIII in patients with HA who were either positive [HAα-FVIII(+)] or negative [HAα-FVIII(-)] for inhibitors.

Methods: Cytokine profiles [interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-4 (IL-4), IL-5, and IL-10] of innate and adaptive immune cells present in the peripheral blood of participants were characterized.

Results: Presence of inhibitors was significantly associated with decreased frequencies of TNF- α -positive monocytes and neutrophils, IL-5-positive monocytes, IL-4-positive neutrophils, and increased frequencies of IL-10-positive neutrophils and T cells. T cells from HAα-FVIII(-) patients expressed increased levels of almost all cytokines. In contrast, HAα-FVIII(+) patients showed lower levels of all cytokines in CD4⁺ and CD8⁺ T cells, except IL-10. B cells from HAα-FVIII(-) patients expressed increased levels of IL-4 while those from HAα-FVIII(+) patients expressed increased levels of IL-10.

Conclusions: The global cytokine profiles of innate and adaptive immune cells showed an anti-inflammatory/regulatory pattern in HAα-FVIII(+) patients and a mixed pattern, with a bias toward inflammatory cytokine profile, in HAα-FVIII(-) patients. The occurrence of these profiles seems to be associated with presence FVIII inhibitors.

Keywords: Immune regulation, Intracellular cytokine staining, Cytokine profile, FVIII inhibitors, Hemophilia A

Background

Hemophilia A (HA) is an X-linked inherited bleeding disorder resulting from a qualitative or quantitative deficiency of clotting factor VIII (FVIII) [1]. HA is classified as mild, moderate, or severe based on the degree of FVIII residual activity [2]. Treatment of patients with HA involves replacement therapy with plasma-derived FVIII (pdFVIII) or recombinant FVIII [3]. A major clinical complication observed during replacement therapy is the development of antibodies against FVIII (called inhibitors) that block its procoagulant activity. Approximately 10%–15% patients with HA and 25%–30% patients with severe

HA develop inhibitors [4]. Patient's age at the time of the first exposure to replacement therapy and type and frequency of FVIII exposure are risk factors for inhibitor formation; in addition, mutations in the gene encoding FVIII and variations in the immune system are important risk factors for inhibitor formation [5]. Anti-FVIII antibodies are immunoglobulin G (IgG) antibodies, mainly IgG4; in some cases, IgG1 and IgG2 can also be detected [6,7].

Type 1 cells have been established to play a role in the initial immune response to FVIII, and type 2 cells act in the development of strong inhibitor production. CD4⁺ T cells are important for the production of inhibitors because they secrete both proinflammatory and anti-inflammatory/regulatory cytokines [8]. Studies have described that polymorphisms in genes encoding cytokines such as TNF- α and IL-10 greatly affect inhibitor

* Correspondence: amandacardoso@cpqrr.fiocruz.br

†Equal contributors

¹Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ/MG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
 Full list of author information is available at the end of the article



production [5,9-11]. Several studies have focused on immune response in patients with HA to elucidate the mechanisms underlying inhibitor production. We observed that the global cytokine profiles of innate and adaptive immune cells showed a major anti-inflammatory/regulatory pattern in patients with HA who were positive for inhibitors [HA α -FVIII(+)] and showed a mixed pattern, with a bias toward an inflammatory cytokine profile, in patients who were negative for inhibitors [HA α -FVIII(-)]. In addition, we proposed that these cytokine profile patterns may be the key elements in the production of distinct subclasses of anti-FVIII antibodies [12-14]. To understand immune response to FVIII, we characterized the cytokine patterns of peripheral blood leukocytes from whole blood samples of healthy blood donors, HA α -FVIII(+) patients, and HA α -FVIII(-) patients. In addition, we examined the differential synthesis of pro-inflammatory (IFN- γ and TNF- α) and anti-inflammatory/regulatory (IL-4, IL-5, and IL-10) cytokines in innate (neutrophils and monocytes) and adaptive (CD4⁺ and CD8⁺ T and B cells) immune cells.

Methods

Study population and sample collection

This case-control study included 85 subjects who were classified into three groups: (1) healthy blood donors (BDs; $n = 30$; mean age, 31.6 ± 12.8 years), (2) patients with HA without history of inhibitors (HA α -FVIII(-); $n = 30$; mean age, 27.6 ± 16.6 years), and (3) patients with HA who had inhibitors (HA α -FVIII(+); $n = 25$; mean age, 21.9 ± 13.8 years; mean anti-FVIII inhibitor level at the time of blood collection, 11.0 UB/mL). All the patients received on-demand (episodic) treatment and were paired by gender and age. Table 1 summarizes the main characteristics of HA α -FVIII(+) patients. Heparinized blood samples from all the subjects were collected in vacutainer tubes (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). All the study subjects visited Fundação Hemominas, Minas Gerais, Brazil. This study was approved by the ethics committee of the Hemominas Foundation and by the National Commission of Ethics in Research, Brazil. Written informed consent for participation in the study was obtained from participants or their parent or

Table 1 Characterization of patients with HA who were positive for inhibitors

Patient number	Age (years)	Level of circulating FVIII	Severity	Historical peak of Bethesda titer (UB/mL)	Bethesda titer (UB/mL) at the time of blood collection
1	11	2.0	Moderate	16.0	16.0
2	19	<1.0	Severe	3.2	0.0
3	35	<1.0	Severe	384.0	20.8
4	11	2.7	Moderate	12.8	8.4
5	14	<1.0	Severe	192.0	20.8
6	13	1.9	Moderate	5.8	5.8
7	40	<1.0	Severe	93.0	16.0
8	19	<1.0	Severe	160.0	12.0
9	27	<1.0	Severe	5.4	5.4
10	6	4.0	Moderate	14.4	6.4
11	37	1.8	Moderate	128.0	0.6
12	22	<1.0	Severe	288.0	115.2
13	31	<1.0	Severe	25.6	14.4
14	14	2.9	Moderate	36.0	5.2
15	8	1.0	Severe	384.0	4.6
16	16	<1.0	Severe	7.0	2.8
17	38	<1.0	Severe	48.0	0.3
18	8	2.8	Moderate	768.0	2.0
19	10	1.0	Severe	48.0	1.2
20	36	1.5	Moderate	13.0	0.0
21	14	<1.0	Severe	52.0	13.2
22	39	<1.0	Severe	3.9	0.0
23	1	1.6	Moderate	6.6	0.5
24	23	<1.0	Severe	224.0	1.4
25	57	<1.0	Severe	20.8	1.0

their guardian where applicable. Patients with HA are frequently examined at the Fundação Hemominas to determine the presence of inhibitors. HA α -FVIII(+) patients were selected based on their positive history of inhibitors. Median time between the first inhibitor production and the time of sampling was 170.8 months (range, 10.9–241.0 months). Any results above 0.6 UB/mL were considered positive for the presence of inhibitors. Patients were selected by carefully analyzing their medical records. Individuals with a history of transient inhibitor production were excluded from the study. All patients with HA did not receive FVIII infusions for 30 days before the date of blood collection to avoid any influence due to a new exposure. Bethesda titer of HA α -FVIII(-) patients was monitored for two months after FVIII exposure to verify the production of inhibitors. Patients with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections and individuals with apparent infections or inflammatory processes were excluded from the study. For all patients, the Bethesda titer was confirmed in a second sample.

Immunophenotyping of cell subsets and intracellular cytokines

Peripheral blood cells were immunostained in the dark for 30 min at room temperature with TriColor-labelled [TC-phycoerythrin (PE)-cyanin 5 (Cy5)] monoclonal antibodies (mAbs) (Caltag, Burlingame, CA, USA), including anti-CD4 (clone S3.5), anti-CD8 (clone M-L233), anti-CD14 (clone Tük4), anti-CD16 (clone 3G8), and anti-CD19 (clone 4G7) mAbs. After lysis/fixation, the leukocytes were permeabilized by incubation with phosphate-buffered saline (PBS) permeabilization reagent (PBS supplemented with 0.5% [w/v] saponin [Sigma, St Louis, MO, USA]) for 10 min at room temperature. Fixed/Permeabilized cells were then incubated in the dark for 30 min at room temperature with 20 μ L PE-labeled anti-cytokine mAbs (IFN- γ , clone B27; TNF- α , clone MAB11; IL-4, clone MP4-25D2; IL-5, clone TRFK5; and IL-10, JES3-9D7 [e-Bioscience, San Diego, CA, USA]) in PBS permeabilization reagent.

Flow cytometry acquisition and analysis

After immunophenotyping, leukocyte suspensions were run in a FACScalibur[®] flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) to collect 30,000 ungated events per sample. The acquired data were analyzed using CellQuest software (Franklin Lakes, NJ, USA). Distinct gating strategies were used to analyze cytokine-expressing leukocyte subpopulations from innate and adaptive immune cells. Neutrophils were selected as SSC^{high}CD16^{high} cells and monocytes were selected as CD14^{high} cells on FL3/anti-CD16-TC and FL3/anti-CD14-TC versus laser side-scatter (SSC) dot plots, respectively. Lymphocyte populations were first selected on laser forward-scatter

(FSC) versus SSC dot plots. The number of gated neutrophils, monocytes, and lymphocytes ranged from 19,500 to 22,500, 1,200 to 2,100, and 6,000 to 9,000, respectively. After the initial gate selection, the frequencies of cytokine-positive cells were quantified using quadrant statistics applied on FL3/anti-cell surface marker-TC versus FL2/anti-cytokine-PE dot plots. PE-Cy5-labeled antibodies were detected on FL3 channel, and PE-labeled antibodies were detected on FL2 channel. Distinct tubes were used to evaluate the percentage of cytokine-positive T cells (CD4⁺ and CD8⁺) and B cells (CD19⁺). Data were expressed as the percentage of cytokine-positive cells among gated neutrophils, monocytes, and total lymphocytes. The results were assembled further to calculate the global cytokine profiles of immune cells, as proposed earlier [12]. Briefly, the median percentage for each cytokine-positive cell population was calculated using the values obtained for each study group [BD, HA α -FVIII(-), and HA α -FVIII(+)] groups].

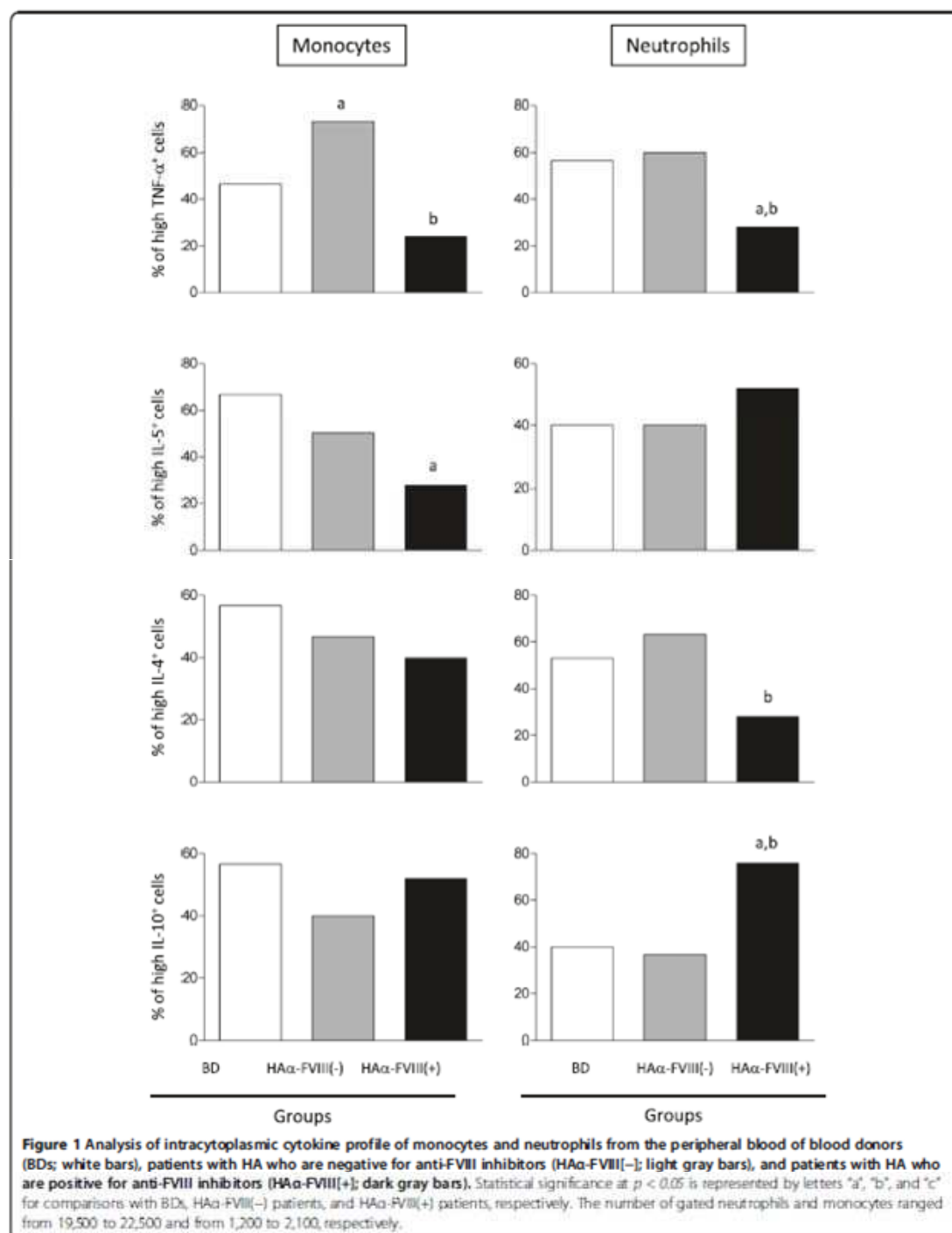
Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 software (San Diego, CA, USA). Because all data files assumed a non-Gaussian distribution, statistical comparisons were performed using non-parametric Kruskal–Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test to evaluate cytokine profiles of innate and adaptive immune cells from BDs, HA α -FVIII(-) patients, and HA α -FVIII(+) patients. Differences were considered significant when p-values were <0.05.

Results

Monocytes and neutrophils from HA α -FVIII(+) patients have an anti-inflammatory/regulatory cytokine profile

Analysis of monocytes showed significantly lower frequencies of TNF- α -positive and IL-5-positive cells in HA α -FVIII(+) patients than in HA α -FVIII(-) patients and BDs. The analyses also showed considerable frequencies of monocytes with a high production of TNF- α in HA α -FVIII(-) group when compared to the BD group. All the three groups had similar frequencies of IL-4-positive and IL-10-positive monocytes. Analysis of neutrophils showed lower frequency of TNF- α -positive cells in HA α -FVIII(+) patients than in HA α -FVIII(-) patients and BDs. Conversely, higher frequencies of IL-10-positive neutrophils were observed in HA α -FVIII(+) patients than in HA α -FVIII(-) patients and BDs. Moreover, lower frequencies of IL-4-positive neutrophils were observed in HA α -FVIII(+) patients than in HA α -FVIII(-) patients. However, the three groups showed similar frequencies of IL-5-positive neutrophils (Figure 1).



High synthesis of IL-10 is the hallmark of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in HA α -FVIII(+) patients

Immunophenotyping of adaptive immune cells showed that T cells (CD4⁺ and CD8⁺) of BDs had basal levels of all the analyzed cytokines. Furthermore, T cells of HA α -FVIII(-) patients had significantly elevated levels of all the cytokines, except IL-10. However, T cells of HA α -FVIII(+) patients only had elevated levels of IL-10 (Figure 2).

B cells from patients with HA and BDs have similar cytokine profiles

Analysis of B cells showed higher levels of IL-4-positive cells in HA α -FVIII(-) patients than in BDs. In addition, higher frequency of IL-10-positive B cells was observed in HA α -FVIII(+) patients than in BDs. However, the three groups showed similar frequencies of TNF- α -positive and IL-5-positive B cells (Figure 3).

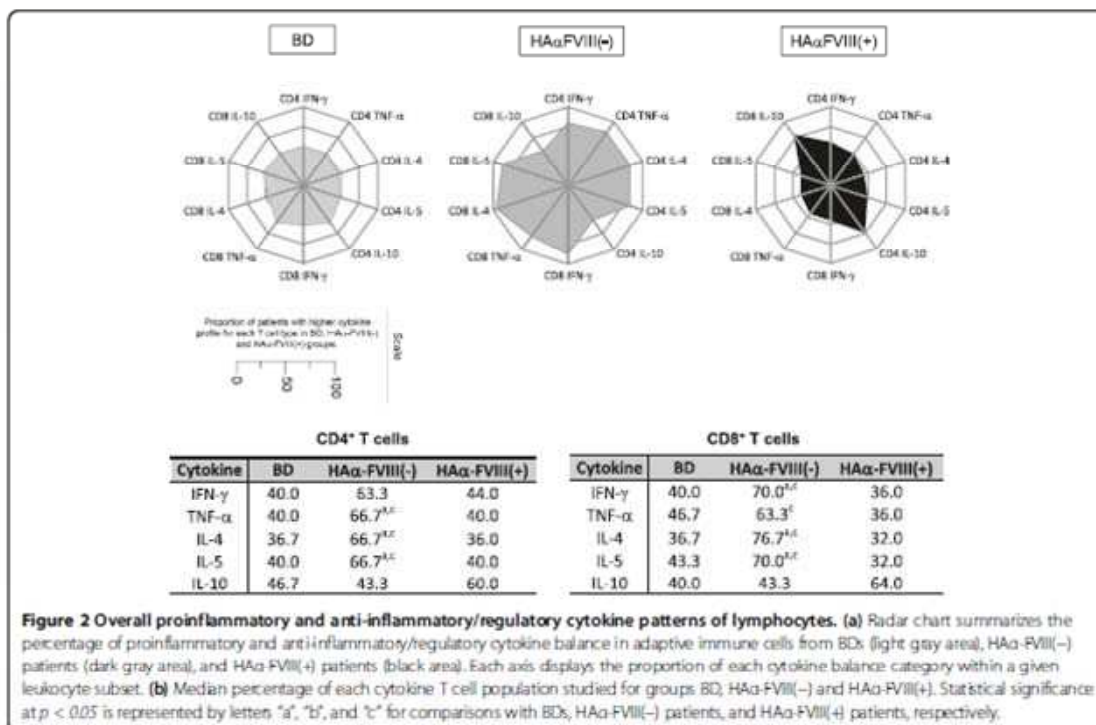
Discussion

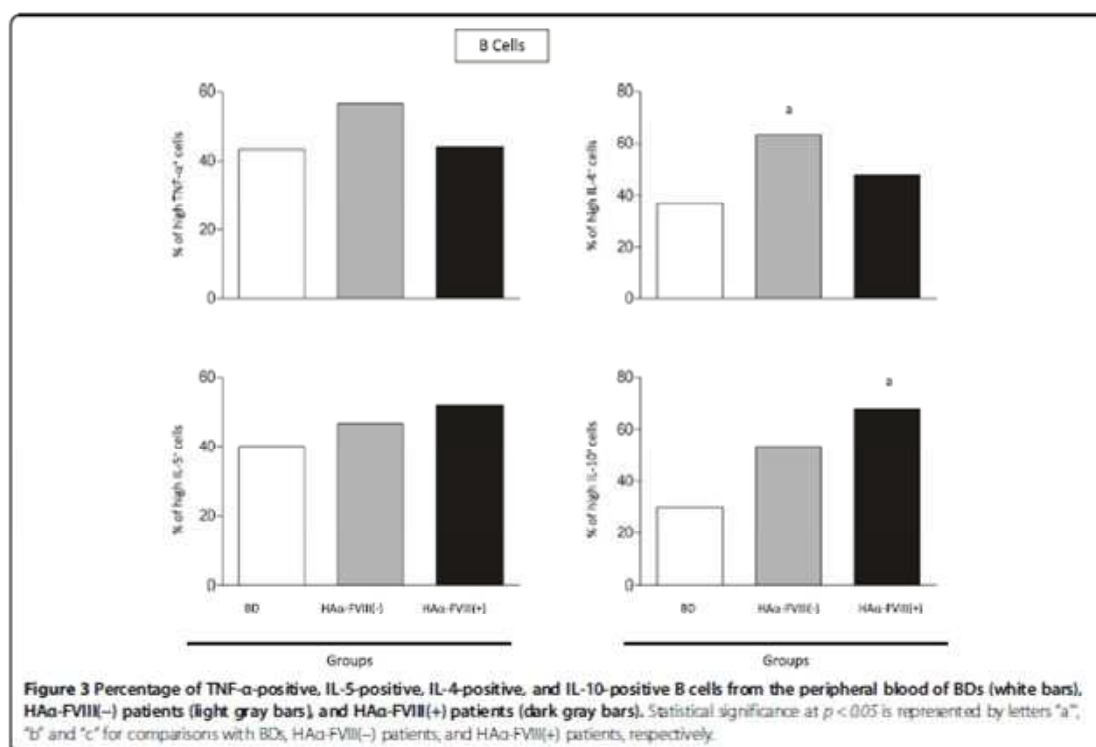
The treatment regimen of FVIII varies among different countries and among centers in the same country. For patients included in this study, on-demand treatment was used to manage clinically evident bleeding. FVIII replacement therapy depends on age, severity, and treatment regimen. Recent studies have shown that median annual on-demand FVIII utilization (IU kg⁻¹·year⁻¹) varies

between 1,100 and 1,429 IU kg⁻¹·year⁻¹ [13,14]. Our data showed that patients receiving on-demand treatment at Fundação Hemominas used 1,452 IU kg⁻¹·year⁻¹ of FVIII. Recent reports have shown that replacement therapy with these amounts of FVIII products can cause several changes in the immune profile of patients with HA [15-19].

Production of anti-FVIII inhibitors remains a challenge in the treatment of patients with HA. Therefore, understanding the cellular compartmentalization of immune responses is important. Little is known about the cytokine profiles and cell types implicated in auto- and alloimmune responses to FVIII. Previous studies have shown that patients with HA who are positive for inhibitors have a major anti-inflammatory/regulatory immune cytokine profile while those without inhibitors have a mixed pattern, with a bias toward an inflammatory cytokine profile. These findings support and suggest that proinflammatory-modulated immune response may favor the synthesis of anti-FVIII IgG1 antibodies and prevent the synthesis of anti-FVIII IgG4 inhibitors [12,20,21]. It has been suggested that immunological context along with the intensity of treatment favors the class switching of FVIII-specific antibodies to IgG4 [22].

The findings of the present study highlight the significantly lower frequencies of TNF- α -positive monocytes and neutrophils, IL-5-positive monocytes, and IL-4-





positive neutrophils and higher frequencies of IL-10-positive neutrophils in HA α -FVIII(+) patients. Recent studies have shown that neutrophils not only synthesize cytokines in response to various inflammatory stimuli in chronic inflammatory disorders (such as rheumatoid arthritis, inflammatory bowel diseases, diabetes, and mycobacterial infections) but also regulate immune responses such as those suggested in HA. Some studies have also proposed that the cytokine profile of neutrophils is similar to the cytokine profiles of monocytes and macrophages. Therefore, modulation of cytokines derived from monocytes and neutrophils is a potentially useful strategy for therapeutic immunointervention [23-25].

Stimulation of B cells to produce FVIII inhibitors is dependent on CD4⁺ T [26]. However, recent reports describe the contribution of CD8⁺ T cells in this context. A recent study has shown an association between CD8⁺ T cells and induction of immune tolerance. It was found that human CD8⁺ T cells also functioned as regulatory T cells to induce immune tolerance by suppressing activated T cells through IL-10 production [27-29]. In addition, CD8⁺ cytotoxic cells mediate the apoptosis of T cells that contribute to peripheral tolerance [30]. Proliferation of CD8⁺ suppressor cells and activated CD8⁺ T cells is observed in patients with HA; moreover, proliferation of suppressor

cells seems to be mainly related to FVIII infusion [31]. These regulatory T cells are important for regulating other T cells without the intervention of antigen-presenting cells (APCs). In addition, it is well known that repeated infusions of pdFVIII concentrates skews TCR repertoires for CD8⁺ T cells [15,19].

Analysis of T cells from HA α -FVIII(-) patients showed elevated levels of almost all cytokines. In contrast, T cells from HA α -FVIII(+) patients showed decreased levels of all the tested cytokines, except IL-10. The immune response against FVIII develops as a classical T cell-dependent antibody-mediated immune response. Infused FVIII is recognized, internalized, and processed by APCs and is presented to antigen-specific CD4⁺ T cells that provide activation signals to antigen-specific B cells, thus resulting in the synthesis of anti-FVIII antibodies and long-lived FVIII-specific memory B cells [8,32,33]. The data obtained in this study showed that the cytokine microenvironment promoted by T cells is determinant for the presence or absence of FVIII inhibitors. These data are consistent with those of different studies that observed a mixed cytokine pattern, with a bias toward an inflammatory cytokine profile, in HA α -FVIII(-) patients and anti-inflammatory/regulatory pattern in HA α -FVIII(+) patients [7,8,12,34]. The changes observed in CD8⁺ T cell compartment also

seem to be related to the production of inhibitors and the regulatory profiles of these cells. In HA α -FVIII(-) patients, increased cytokine production by lymphocytes contributed to the prevention of inhibitor production by modulation of the immune system; in contrast, in the inhibitor-positive patients, reducing the production of cytokines inducing immune microenvironment modifying the expansion of lymphocytes with a regular profile, increasing the production of IL-10 in order to re-modulate the immune system; However, other changes, which need investigation, prevent this process, thus resulting in the production of inhibitors.

Analysis of B cells showed that HA α -FVIII(-) patients had higher levels of IL-4-positive B cells and HA α -FVIII(+) patients had higher levels of IL-10-positive B cells. Because of their central role in inhibitor production, it is important to elucidate the cytokine profile of B cells in patients with HA. The IL-10-predominant cytokine profile of B cells observed in this study is well characterized as a downregulator of TNF- α , IL-1 α , and IL-1 β production. However, it stimulates B cell proliferation and differentiation and antibody production [35]. Importantly, B cells are not merely antibody producers but actively contribute by regulating immune response and secreting cytokines that amplify humoral and cellular immune responses [36-39].

Conclusions

Typically, various cytokines and chemokines act as mediators in an immune response. It is important to note that genes encoding IL-10 and TNF- α were the first genes located outside the gene encoding FVIII to be associated with inhibitor production in patients with HA [9-11,40]. However, different risk factors such as ethnicity, type of mutation in the gene encoding FVIII, family history of inhibitor production, type of FVIII (plasmatic or recombinant) therapy, patient age at the time of first exposure to replacement therapy, initial doses of FVIII concentrate, mode of infusion, surgery, intensity of treatment or regular prophylaxis, and inflammatory state or HLA haplotype of patients are associated with inhibitor production and should be investigated further. Other causes of inhibitor production against FVIII include stress, age, malignancy, coinfections, pregnancy, and antibiotics [41-43]. Based on these findings, we hypothesize that anti-inflammatory/regulatory cytokine-dominant microenvironment determined by monocytes, neutrophils, T cells, and B cells may favor the synthesis of anti-FVIII IgG4 with inhibitory activity. In addition, the proinflammatory microenvironment corroborates with the synthesis of anti-FVIII IgG1 non-inhibitory antibody [12,20,21].

The limitations of the study include limited number of patients and absence of information on mutations in the gene encoding FVIII. An important issue to be considered in future investigations is to analyze the kinetic conversion of a proinflammatory immune response to an anti-

inflammatory/regulatory immune response against FVIII in HA α -FVIII(+) patients and the risk factors that may be associated with this conversion during HA treatment. The anti-inflammatory/regulatory cytokine profile of innate immune cells in patients with HA could be an important biomarker for the development of high inhibitor titers [7].

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

ACOS carried out the immunoassays, analysis and interpretation of data and drafted the manuscript. MAPS conducted the follow-up of patients. IGR carried out the immunoassays. DGC participated in the design of the study, carried out the immunoassays, analysis and interpretation of data, drafted the manuscript and performed the statistical analysis. OAMF conceived and coordinated the study. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

We thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMG) financial support. OAMF is thankful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the research fellowship (PQ) and D.G.C. acknowledges the FAPEMG for the BIP fellowship programme.

Author details

¹Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ/MG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ²Serviço de Pesquisa, Fundação Hemominas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Received: 24 June 2014 Accepted: 8 December 2014

Published online: 16 January 2015

References

- Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry*. 1991;30 Suppl 4:310363-70.
- Fischer K, Van Den Berg M. Prophylaxis for severe haemophilia: clinical and economical issues. *Haemophilia*. 2003;9 Suppl 4:376-81.
- Spiegel PC, Stoddard BL. Optimization of factor VIII replacement therapy: Can structural studies help in evading antibody inhibitors? *Br J Haematol*. 2002;119 Suppl 2:310-22.
- Wight J, Paisley S. The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. *Haemophilia*. 2003;9 Suppl 4:418-35.
- Agostini D, Rosset C, Botton MR, Kappel DB, Veira IA, Gorzias RP, et al. Immune system polymorphisms and factor VIII inhibitor formation in Brazilian haemophilia A severe patients. *Haemophilia*. 2012;18 Suppl 6:16-8.
- Lollar P. Pathogenic antibodies to coagulation factors. Part one: factor VIII and factor IX. *J Thromb Haemost*. 2004;2 Suppl 7:1082-95.
- 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 haemophilia patients. *Thromb Haemost*. 2002;88 Suppl 4:568-75.
- Hu G, Guo D, Key NS, Conti-Fine BM. Cytokine production by CD4+ T cells specific for coagulation factor VIII in healthy subjects and haemophilia A patients. *Thromb Haemost*. 2007;97 Suppl 5:788-94.
- Astermark J, Oldenburg J, Carlsson J, Pavlova A, Kavakli K, Berntorp E, et al. Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with haemophilia A. *Blood*. 2006;108 Suppl 12:3739-45.
- Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, LeVert AK, Mills Study Group. Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with haemophilia A. *Blood*. 2006;107 Suppl 8:3167-72.
- Chaves DG, Belisario AR, Castro G, Santoro MM, Velloso-Rodrigues C. Analysis of cytokine genes polymorphism as markers for inhibitor development in haemophilia A. *Int J Immunogenet*. 2010;37 Suppl 2:79-82.
- Chaves DG, Velloso-Rodrigues C, Oliveira CA, Santoro MM, Martins-Filho AO. 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. *Clin Exp Immunol*. 2010;162 Suppl 3:425-37.

13. Nerich V, Tissot E, Faadji A, Demesmay K, Bertrand MA, Lorenzini JL, et al. Cost-of-illness study of severe haemophilia A and B in five French haemophilia treatment centres. *Pharm World Sci.* 2008;30:287–92.
14. Epstein J, Xiong Y, Woo P, Li-McLeod J, Spotts G. Retrospective analysis of differences in annual factor VIII utilization among haemophilia A patients. *Haemophilia.* 2012;18:187–92.
15. Matsutani T, Sakurai Y, Yoshioka T, Tsuruta Y, Suzuki R, Shima M, et al. Replacement therapy with plasma-derived factor VIII concentrates induces skew in T-cell receptor usage and clonal expansion of CD8+ T-cell in HIV-seronegative hemophilia patients. *Thromb Haemost.* 2003;90:279–92.
16. Gouw SC, Van Den Berg HM, Le Cassie S, Van Der Bom JG. Treatment characteristics and the risk of inhibitor development: a multicenter cohort study among previously untreated patients with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 2007;5:1383–90.
17. Gouw SC, Van Der Bom J, Van Den Berg HM. Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood.* 2007;109 Suppl 11:4648–54.
18. Van Helden PMW, Van Haren SD, Fijnvandraat K, Van Den Berg HM, Voorberg J. Factor VIII-specific B cell responses in haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia.* 2010;16:35–43.
19. Sakurai Y, Matsutani T, Yoshioka T, Takeda T, Yoshioka A, Shima M. Alterations of T cell receptor Vβ repertoire of CD8 T lymphocytes in immune tolerance induction in two hemophilia A patients with inhibitors. *Vojnosanit Pregl.* 2011;68 Suppl 12:1047–50.
20. Oliveira CA, Veloso-Rodrigues C, Machado FC, Carvalho BN, Gentz SH, Martins-Filho DA, et al. Cytokine profile and FVIII inhibitors development in haemophilia A. *Haemophilia.* 2013;19 Suppl 3:139–42.
21. Pimentel JP, Chaves DG, Araújo AR, de Araújo EM, da Silva F, Neves WL, et al. Anti-inflammatory/regulatory cytokine microenvironment mediated by IL-4 and IL-10 coordinates the immune response in hemophilia A patients infected chronically with hepatitis C virus. *J Med Virol.* 2013;85 Suppl 6:1009–18.
22. Van Helden PMW, Van Den Berg HM, Gouw SC, Kaijen PH, Zuurveld MG, Mazzer-Bunschoten EP, et al. IgG subclasses of anti-FVIII antibodies during immune tolerance induction in patients with hemophilia A. *Br J Haematol.* 2008;142 Suppl 4:644–52.
23. Kasama T, Miwa Y, Isezaki T, Odai T, Adachi M, Kuniel SE. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. *Curr Disg Targets Inflamm Allergy.* 2005;4 Suppl 32:73–9.
24. Hatanaka E, Monteagudo PT, Marrocos MS, Campa A. Neutrophils and monocytes as potentially important sources of proinflammatory cytokines in diabetes. *Clin Exp Immunol.* 2006;146 Suppl 3:443–7.
25. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards JC. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford).* 2010;49 Suppl 9:1618–31.
26. Wroblewska A, Reijntjens BM, Platt RW, Voorberg J. Dangerous liaisons: how the immune system deals with factor VIII. *J Thromb Haemost.* 2013;11:47–55.
27. Le Gal FA, Ritteau B, Sedlik C, Khali-Daher I, Menier C, Dausset J, et al. HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol.* 1999;11:1351–6.
28. Endharti AT, Rifai M, Shi Z, Fukukoika Y, Nakahara Y, Kawamoto Y, et al. Cutting Edge: CD8CD122 Regulatory T Cells Produce IL-10 to Suppress FN Production and Proliferation of CD8 T Cells. *J Immunol.* 2005;175:7093–7.
29. Shi Z, Okuno Y, Rifai M, Endharti AT, Akane K, Itoke K, et al. Human CD8CXCR3 T cells have the same function as murine CD8CD122 Treg. *Eur J Immunol.* 2009;39:2106–19.
30. Hemdon JM, Stuart PM, Ferguson TA. Peripheral Deletion of Antigen-Specific T Cells Leads to Long-Term Tolerance Mediated by CD8 Cytotoxic Cells. *J Immunol.* 2005;174:4098–104.
31. Danzani U, Pileri A, Bianchi A, Campori A, Tamponi G, Massaia M. Biochemical and immunologic abnormalities in peripheral blood T lymphocytes of patients with hemophilia A. *Eur J Haematol.* 1988;41 Suppl 4:334–40.
32. André S, Meslier Y, Dimitrov DJ, Repessé Y, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S, et al. A cellular viewpoint of anti-FVIII immune response in hemophilia A. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2009;37 Suppl 2:105–13.
33. Pautard B, D'Oillon R, Te Li Thiao V, Lavend'Homme R, Saint-Ilemy JM, Peerlinck K, et al. Successful immune tolerance induction by FVIII in hemophilia A patients with inhibitor may occur without deletion of FVIII-specific T cells. *J Thromb Haemost.* 2011;9 Suppl 6:1163–70.
34. Qadara M, Othman M, Waters B, Chegeni R, Walker K, Labelle A, et al. Reduction of the immune response to factor VIII mediated through tolerogenic factor VIII presentation by immature dendritic cells. *J Thromb Haemost.* 2008;6 Suppl 12:2095–104.
35. Rousset F, Garcia E, DeFrance T, Péronne C, Vezzo N, Hsu DH, et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89 Suppl 5:1890–3.
36. Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol.* 2000;1 Suppl 6:475–82.
37. Duddy ME, Alter A, Bar-Or A. Distinct profiles of human B cell effector cytokines: A role in immune regulation? *J Immunol.* 2004;172 Suppl 63422–7.
38. Lund FE. Cytokine-producing B lymphocytes - key regulators of immunity. *Curr Opin Immunol.* 2008;20 Suppl 3:332–8.
39. Wojciechowski W, Harris DP, Sprague F, Mousseau B, Makris M, Kuser K, et al. Cytokine-producing effector B cells regulate type 2 immunity to *H. polygyrus*. *Immunity.* 2009;30 Suppl 3:421–33.
40. Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia.* 2006;12 Suppl 6:15–22.
41. Lacroix-Desmazes S, Navarrete AM, André S, Bayry J, Kaveri SV, Dasgupta S. Dynamics of factor VIII interactors determine its immunologic fate in hemophilia A. *Blood.* 2008;112 Suppl 2:240–9.
42. Ghosh K, Shety S. Immune response to FVIII in hemophilia A: an overview of risk factors. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2009;37 Suppl 258–66.
43. Pinto P, Ghosh K, Shety S. Immune regulatory gene polymorphisms as predisposing risk factors for the development of factor VIII inhibitors in Indian severe hemophilia A patients. *Haemophilia.* 2012;18 Suppl 5:794–7.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



