



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADES DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

JÉSSICA OLIVEIRA FRADE GUANAES

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR AO FATOR VIII DA
COAGULAÇÃO EM PACIENTES COM HEMOFILIA A ADQUIRIDA EM UM
ESTUDO LONGITUDINAL**

Campinas
2023

JÉSSICA OLIVEIRA FRADE GUANAES

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR AO FATOR VIII DA
COAGULAÇÃO EM PACIENTES COM HEMOFILIA A ADQUIRIDA EM UM
ESTUDO LONGITUDINAL

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências, na área de concentração Clínica Médica.

Thesis presented to the School of Medical Sciences of University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for Philosophy Doctor (Ph.D.) degree, in Internal Medicine.

ORIENTADORA: PROFESSORA DOUTORA MARGARETH CASTRO OZELO

Esse trabalho corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Jéssica Oliveira Frade Guanaes, orientada pela Profa. Dra. Margareth Castro Ozelo.

CAMPINAS
2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

F841a Frade-Guanaes, Jéssica Oliveira, 1992-
Avaliação da resposta imune celular ao Fator VIII da coagulação em pacientes com hemofilia A adquirida em um estudo longitudinal / Jéssica Oliveira Frade Guanaes. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Margareth Castro Ozelo.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hemofilia A. 2. Inibidores dos fatores de coagulação sanguínea. 3. Fator VIII. 4. Fator ativador de células B. 5. Imunidade celular. I. Ozelo, Margareth Castro, 1970-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Evaluation of the cellular immune response to coagulation Factor VIII in patients with acquired hemophilia A in a longitudinal study

Palavras-chave em inglês:

Hemophilia A
Blood coagulation factor inhibitors
Factor VIII
B-cell activating factor
Immunity, Cellular

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Margareth Castro Ozelo [Orientador]
Paula Ribeiro Villaça
Andrea Aparecida Garcia Guimarães
Zoraida Sachetto

Fernanda Loureiro de Andrade Orsi

Data de defesa: 08-08-2023

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-1008-4458>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/3996174667821731>

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

JÉSSICA OLIVEIRA FRADE GUANAES

ORIENTADORA: MARGARETH CASTRO OZELO

MEMBROS:

- 1. PROFA. DRA. MARGARETH CASTRO OZELO**
- 2. PROFA. DRA. PAULA RIBEIRO VILLAÇA**
- 3. PROFA. DRA. ANDREA APARECIDA GARCIA GUIMARÃES**
- 4. PROFA. DRA. ZORAIDA ZACHETTO**
- 5. PROFA. DRA. FERNANDA LOUREIRO DE ANDRADE ORSI**

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data da Defesa: 08/08/2023

Dedico os frutos deste trabalho aos médicos que lutam para diagnosticar e cuidar de doença tão rara que é a hemofilia A adquirida, mas sobretudo aos pacientes e familiares, que enfrentam firmes a doença. Minha torcida é que esse pequeno tijolinho um dia seja útil para construir a estrada que um dia tornará a vida de vocês muito melhor.

AGRADECIMENTOS

A verdade é que esse mundo não nos permite fazer nada sozinhos, e os projetos de vida que são executados em conjunto são muito mais gratificantes, proveitosos e enriquecedores. Escrevo meus agradecimentos com o coração repleto de alegria e gratidão pela imensa bondade e cuidado de Deus comigo, que tão sabiamente me proporcionou um caminho desafiador – que definitivamente me garantiu muito crescimento, e ao mesmo tempo, de modo tão delicado, me presenteou com pessoas maravilhosas para que a jornada tenha sido mais florida. Todas são preciosas providências para que após anos no curso do doutorado, tenham me ajudado, guiado e diversas vezes apoiado. O mais engraçado, é que conforme escrevo entendo, que nenhum tem mais ou menos importância, e que sim somam uma equação linda, que me faz ser quem sou hoje, anos após ter iniciado essa jornada.

Agradeço a minha família, que suporta meus sonhos e investe nos meus mais loucos planos. Meus pais, que são fonte de inspiração e a certeza de que estou no caminho certo. Meus irmãos que tanto amo, especialmente a Nandinha, que desde tão pequenina fingia interesse em me ouvir estudar assuntos que eu não fazia ideia do que se tratavam (sempre com uma intervenção engraçada que dizia: interessante! Conte-me mais sobre isso!). Meu esposo, Renan, que além de ser meu melhor amigo, tem sido paciente nessa jornada de experimentos e ensaios longos, e que por muitas vezes madrugou comigo, para que eu estivesse a tempo no laboratório. Por ser compreensivo nos momentos em que não posso estar presente de corpo e de alma, e por investir e cuidar de nós de forma tão linda. Agradeço, que com toda a paciência do mundo (que aliás, é muita!) tem suportado meus desabafos, lágrimas, euforias, e acima de tudo tem apoiado minhas aspirações e sonhos em aprender cada dia mais.

Agradeço também aos meus amigos que não estão comigo diariamente no laboratório, principalmente a Elisa, que foi e é até hoje uma grande professora, orientadora “*off-label*”, comadre e acima de tudo uma grande amiga. Uma verdadeira inspiração, que me ensinou muito do que sei sobre pesquisa, e me guiou

em momentos que estive perdida e precisava enxergar uma luz no final do túnel, e que até hoje me mostra constantemente as belezas e verdades da vida.

Ao Josi, Stella, Naomi, e muitos outros que conhecem e partilham minha mesa e minha saga: são pesquisadores natos, exímios em suas áreas. São grandes exploradores das certezas do coração e das incertezas da vida. São amigos fiéis que ouvem minhas lamúrias (são muitas, eu sei), me ajudam desde o texto até a estatística. Vocês tornam minha caminhada mais leve.

Aos meus amigos de bancada, minha gratidão por terem sido apoio e clareza em momentos de dúvidas. Ana Racanelli, você é minha dupla e sou muito feliz pelas voltas que a vida deu, principalmente pela oportunidade de ter dividido com você esse projeto, os pacientes e dados, e acima de tudo, pela amizade e laços que formamos, que com certeza não serão extinguidos tão cedo. Você é calma, bondade e leveza, e nossos opostos fazem nossa amizade ser ainda mais gratificante. Amo você, e amo o Bebenja, meu melhor amiguinho! Agradeço a Steph, que me acolheu, ajudou e me ensinou o que sei sobre cultura e muito sobre a bancada. À Ucha, que sempre prontamente está à disposição para estender a mão, e que é uma profissional ímpar. À Gabi, pelos olhos de águia, pela amizade e pela parceria. Você também é uma providência na minha vida, e não sou capaz de expressar o tamanho da minha gratidão por me ajudar a refinar meus trabalhos, que com um cuidado impecável e uma percepção linda para a ciência faz com que a pesquisa se torne ainda mais agradável.

Agradeço aos alunos do Laboratório de Hemostasia e Inflamação, em especial à Franci e à Carla, que são amigas que vou levar para a vida. Foram suporte na fase em que o mundo estava lacrado e precisávamos mais de contato humano como nunca, onde poucos se viam e mesmo com distância e revezamento estávamos sempre em contato. Obrigada pelos laços que estreitamos durante essa jornada. Pela companhia excepcional e pelos cafés compartilhados. Vocês me acolhem até hoje, e muitas vezes me sinto um “anexo” ao laboratório de vocês.

Agradeço à Ana Paula Francisco, que me dá suporte com os PBMCs, que possui leveza, cuidado e carisma, e está sempre a postos. À Silmara, que possui

uma mente sempre afiada e muito perspicaz, e que é uma excelente companhia para discutir e elocubrar o raciocínio científico. Obrigada pelo tempo, pelas ideias, e por me ajudar a desempacar quando precisei. Agradeço às meninas do ambulatório de hemofilia, a Andrea, Val, Vanessa pela colaboração, por serem tão cuidadosas com os pacientes, e trabalharem em conjunto tão bem! Vocês são peça essencial, que permitiram que amostras e informações primordiais estivessem disponíveis sempre quando necessário. É um prazer trabalhar com vocês! Não posso deixar de agradecer também a Irene, que me ajudou “milhares e zilhães” de vezes com a concepção dos painéis, ajustes e interpretação dos experimentos realizados. Obrigada pela paciência, pela disponibilidade em me atender em todos os momentos que precisei. Esses dados são fruto do seu auxílio.

Agradeço aos meus alunos, que provavelmente não saibam, mas fazem de mim alguém melhor diariamente. São capazes de me ensinar muito mais do que eu poderia tentar oferecer ao compartilhar meus conhecimentos com eles. Todos vocês são um orgulho para mim, e me inspiram a buscar sempre crescimento. Luiz, você especialmente, que se tornou um amigo, e tem sido um ótimo companheiro de destino. Tenho muito orgulho do seu desenvolvimento.

Agradeço também à Marga, por ser uma excelente orientadora, e a qual não tenho palavras suficientes para expressar toda a gratidão pela direção que tenho recebido durante esses anos. Obrigada por depositar confiança e acreditar em mim (muito mais do que mereço, e me sinto capaz). Você impulsiona minhas ideias, e me ajuda a centrar e caminhar no trajeto mais sensato. Sou muito grata a Deus pela sua vida. Você sabe lidar com meus 220 volts de potência que estão sempre ligados, e com muita paciência me ajudou a superar todos os desafios que o doutorado apresentou. Se fui “reclamona” ou pareci descontente, tenha a certeza de que sou muito feliz e grata pela trajetória que tivemos até aqui. Seu ânimo em trabalhar é contagiante, e sua transparência, generosidade e sabedoria são peças fundamentais que permitem que passos tão grandes sejam alcançados, o que faz com que você colha frutos tão lindos. Muito obrigada por todo o conhecimento e maturidade (pessoal e científica) que pude obter sob sua orientação. Sua direção com certeza foi fundamental para que eu tenha me tornado quem sou hoje.

Também agradeço à UNICAMP e ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Processo: nº425332/2016-0

E por fim, se caso por um descuido meu, pela emoção transbordando, ou pela falta de palavras, não tenha sido justa e agradecido a todos que estão em meu coração (que não são poucos), deixo a vocês esse poema, do Efraim Rodrigues, que traduz exatamente como me sinto:

“Aos que se tornaram familiares;
Aos que nasceram familiares e aos que conheci antes de ontem;
Aos que me deixaram louco e aos que enlouqueci;
Aos que me criticaram em tudo e a um ou outro que aturou minha “chatura”;
Aos amigos que passaram e aos que se estagnaram em mim;
Aos que me consideram muito e aos que com razão fizeram pouco;
Aos que conhecem o que penso e aos que só conhecem o que faço;
Aos que passam o dia todo comigo e aos que estão o tempo todo em mim.
Este trabalho é a soma de todos vocês.
E se não é melhor, é por falta de memória, mas não por falta de amigos”.

RESUMO

A hemofilia A adquirida (HAA) é uma doença hemorrágica autoimune rara, causada pela produção de inibidores contra o fator VIII (FVIII) da coagulação, que apresenta alta taxa de morbimortalidade. A raridade da doença e a incidência maior em pacientes idosos dificulta a realização de estudos capazes de compreender os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelo aparecimento desses inibidores. Portanto, o objetivo desse estudo é avaliar os mecanismos imunológicos envolvidos na HAA, com foco na resposta imune celular no desenvolvimento de inibidor ao FVIII e em relação à resposta imunossupressora, em uma coorte seguida longitudinalmente. Esse é um estudo longitudinal observacional que recrutou pacientes diagnosticados com HAA que fizeram acompanhamento no Hemocentro Unicamp entre 2014 até 2022. Foram incluídos 23 pacientes (inibidor > 0,6 UB/dL e FVIII < 50%), e o tratamento imunossupressor de primeira linha consistiu predominantemente na associação de prednisona com ciclofosfamida. Os pacientes que recaíram foram indicados para uso de rituximabe como segunda linha. Além dos dados clínicos, amostras de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram coletadas e criopreservadas para analisar a resposta celular. As células foram cultivadas sob diferentes estímulos, incluindo FVIII, por 24h e analisadas por citometria de fluxo, onde as frequências de diferentes citocinas foram quantificadas com intenção de verificar a atividade dos subtipos de linfócitos T auxiliares (CD4⁺) e linfócitos B (CD19⁺) em diferentes momentos do acompanhamento. Quatro pacientes foram censurados por dados insuficientes no seguimento. Dentre o grupo de pacientes não censurados (N=20), 70% alcançaram remissão completa sustentada e 30% recaíram ou falharam ao protocolo de primeira linha. Os pacientes com remissão sustentada demonstraram ao diagnóstico uma resposta predominantemente mediada por células T efectoras (*T helper*), incluindo as células Th17 e células efectoras T foliculares (Tfh). Isso pode ser concluído pela observação de níveis elevados de citocinas responsáveis pela atividade de linfócitos Th17, incluindo aumento nas frequências de IL-17a ($P = 0,01$) e TGF- β ($P = 0,05$). No caso dos linfócitos Tfh, devido a produção elevada de IL-21 ($P = 0,02$). Ademais, esse estudo observou que os pacientes que recaíram ou falharam também possuem uma resposta mediada por Th1, pelo aumento na

frequência de TNF- α ($P = 0,05$) e IFN- γ ($P = 0,0001$). Na avaliação dos linfócitos B (CD19⁺), observou-se um aumento intracelular de BAFF (*B cell activating factor*) e APRIL (*a proliferation inducing ligand*), ao diagnóstico desses pacientes. A frequência de BAFF do grupo recaída/falha é significativamente maior do que o grupo de remissão completa sustentada ($P = 0,05$). Esse estudo também correlacionou as titulações de imunoglobulinas (Igs) dos pacientes com a produção de citocinas, observando uma correlação moderada entre IgA anti-FVIII e IL-17a ($r = 0,52$; $P = 0,02$) e TGF- β ($r = 0,57$; $P = 0,02$) no grupo de remissão completa sustentada. Uma correlação forte no grupo de pacientes que recaíram ou falharam ao tratamento também foi observada entre IgG4 anti-FVIII e a frequência de IL-4 ($r = 0,96$; $P = 0,0001$) e IL-21 ($r = 0,964$; $P = 0,0001$). Esses dados sugerem que o perfil de resposta imune celular em pacientes que atingiram remissão completa sustentada é diferente dos pacientes que evoluem com recaída ou falha ao tratamento imunossupressor, com a ativação de células Th1 em pacientes refratários, o que pode contribuir para a persistência do inibidor. O aumento significativo na produção de BAFF, IL-4, TNF- α e IFN- γ apenas no grupo de recaída/falha pode indicar um papel de potenciais preditores para a resposta à terapia imunossupressora na HAA.

Palavras-chave: hemofilia A adquirida, inibidores dos fatores da coagulação sanguínea, fator VIII, BAFF, imunidade celular

ABSTRACT

Acquired hemophilia A (HAA) is a rare autoimmune hemorrhagic disease, caused by the production of inhibitors against coagulation factor VIII (FVIII), which has a high morbidity and mortality rate. The rarity of the disease and the higher incidence in elderly patients make it difficult to carry out studies capable of understanding the pathophysiological mechanisms responsible for the appearance of these inhibitors. Therefore, the objective of this study is to evaluate the immunological mechanisms involved in AHA, with a focus on the cellular immune response in the development of an FVIII inhibitor and in relation to the immunosuppressive response, in a cohort followed longitudinally. This is a longitudinal observational study that recruited patients diagnosed with AH who were followed up at Blood Center, Unicamp, between 2014 and 2022. We included 23 patients (inhibitor > 0.6 UB/dL and FVIII < 50%), and first-line immunosuppressive treatment consisted predominantly of the association of prednisone with cyclophosphamide. Patients who relapsed were indicated for use of rituximab as a second line. In addition to clinical data, peripheral blood mononuclear cell (PBMC) samples were collected and cryopreserved to analyze cellular response. The cells were cultivated under different stimuli, including FVIII, for 24h and analyzed by flow cytometry, where the frequencies of different cytokines were quantified with the intention of verifying the activity of subtypes of helper T lymphocytes (CD4⁺) and B lymphocytes (CD19⁺) in different follow-up times. Four patients were censored for insufficient data at follow-up. Among the group of uncensored patients (N=20), 70% achieved sustained complete remission and 30% relapsed or failed the first-line protocol. Patients with sustained remission demonstrated at diagnosis a response predominantly mediated by effector T cells (T helper), including Th17 cells and follicular T effector cells (Tfh). This can be concluded by observing elevated levels of cytokines responsible for Th17 lymphocyte activity, including increased frequencies of IL-17a (P = 0.01) and TGF- β (P = 0.05). In the case of Tfh lymphocytes, due to high production of IL-21 (P = 0.02). Furthermore, this study observed that patients who relapsed or failed also had a Th1-mediated response, by increasing the frequency of TNF- α (P = 0.05) and IFN- γ (P = 0.0001). In the evaluation of B lymphocytes (CD19⁺), an intracellular increase of BAFF (B cell activating factor) and APRIL (a proliferation inducing

ligand) was observed at the diagnosis of these patients. The BAFF frequency of the relapse/failure group is significantly greater than that of the sustained complete remission group ($P = 0.05$). This study also correlated patients' immunoglobulin (Igs) titers with cytokine production, noting a moderate correlation between anti-FVIII IgA and IL-17a ($r = 0.52$; $P = 0.02$) and TGF- β ($r = 0.57$; $P = 0.02$) in the sustained complete remission group. A strong correlation in the group of patients who relapsed or failed treatment was also observed between anti-FVIII IgG4 and the frequency of IL-4 ($r = 0.96$; $P = 0.0001$) and IL-21 ($r = 0.964$; $P = 0.0001$). These data suggest that the cellular immune response profile in patients who achieved sustained complete remission is different from patients who relapse or fail immunosuppressive treatment, with activation of Th1 cells in refractory patients, which may contribute to inhibitor persistence. The significant increase in the production of BAFF, IL-4, TNF- α and IFN- γ only in the relapse/failure group may indicate a role of potential predictors for the response to immunosuppressive therapy in AHA.

Keywords: acquired hemophilia A, inhibitors of clotting factors, factor VIII, BAFF, cellular immunity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Principais terapias utilizadas no tratamento da HAA	31
Figura 2. Ativação de células T CD4 em suas funções efetoras	34
Figura 3. Subtipos das células T auxiliares e perfil de citocinas produzido	36
Figura 4. Mecanismos gerais de autoimunidade	41
Figura 5. Estrutura da molécula do FVIII	44
Figura 6. Acompanhamento longitudinal dos níveis de FVIII:C e atividade do inibidor anti-FVIII do paciente 8	57
Figura 7. Acompanhamento longitudinal da produção de citocinas em células CD4 ⁺ e CD19 ⁺ do paciente 8	58
Figura 8. Acompanhamento longitudinal dos níveis de FVIII:C e atividade do inibidor anti-FVIII da paciente 16	59
Figura 9. Acompanhamento longitudinal dos níveis de FVIII:C e atividade do inibidor anti-FVIII da paciente 16	60
Figura 10. Expressão de IL-17a em pacientes com hemofilia A adquirida	62
Figura 11. Expressão de TGF- β em pacientes com hemofilia A adquirida	63
Figura 12. Expressão de Células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ (Tregs) em pacientes com hemofilia A adquirida	64
Figura 13. Expressão de IL-21 em pacientes com hemofilia A adquirida	65
Figura 14. Expressão de IL-4 em pacientes com hemofilia A adquirida	66
Figura 15. Expressão de IFN- γ em pacientes com hemofilia A adquirida	67
Figura 16. Expressão de TNF- α em pacientes com hemofilia A adquirida	67
Figura 17. Expressão de BAFF em pacientes com com hemofilia A adquirida ...	69

Figura 18. Expressão de APRIL em pacientes com com hemofilia A adquirida ..	70
Figura 19. Análise da produção de citocinas em pacientes com HAA de acordo com a etiologia da doença (IL-17a, TGF- β , IFN- γ e TNF- α)	71
Figura 20. Análise da produção de citocinas em pacientes com HAA de acordo com a etiologia da doença (IL-4, IL-21, BAFF e APRIL)	72
Figura 21. Correlação entre os títulos de anticorpos de imunoglobulinas anti-FVIII e citocinas de todos os pacientes com HAA.....	73
Figura 22. Correlação entre os títulos de imunoglobulinas anti-FVIII e citocinas de pacientes com HAA que recaíram ou falharam ao tratamento imunossupressor .	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre a fisiopatologia da HAA e da HA	23
Tabela 2. Definições para diagnóstico de hemofilia A adquirida e seus desfechos	48
Tabela 3. Características demográficas e clínicas ao diagnóstico.....	51
Tabela 4. Terapia imunossupressora utilizada.....	52
Tabela 5. Principais efeitos colaterais reportados associados à imunossupressão	53
Tabela 6. Características clínicas ao diagnóstico e esquema terapêutico.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABC – células B associadas à idade (*age-associated B cells*)
- APRIL – um ligante indutor de proliferação (*a proliferation inducing ligand*)
- APC – célula apresentadora de antígeno (*antigen presenting cells*)
- AVC – acidente vascular cerebral
- BAFF – fator ativador de células B (*B cell activating factor*)
- BAFF-R – receptor do fator ativador de células B (*receptor of B cell activating factor*)
- BCMA – antígeno de maturação de células B (*B-cell maturation antigen*)
- BCR – receptor de células B (*B cell receptor*)
- CPPa – complexo protrombínico ativado
- CTLA-4 – antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos
- CVP – ciclofosfamida + vincristina + prednisona
- ELISA – imunoenensaio enzimático (Enzyme Linked Immunoassay)
- EPCR – receptor da proteína C endotelial
- FoxP3 – forkhead box P3
- FT – fator tecidual
- FTr – fator de transcrição
- FVIII – fator VIII da coagulação
- FVIII KO – fator VIII da coagulação *knockout*
- FVW – fator de von Willebrand
- HA – hemofilia A congênita
- HAA – hemofilia A adquirida
- HIV – vírus da imunodeficiência humana
- IFN- γ – interferon gama

Ig – imunoglobulinas

IgA – imunoglobulina A

IgG1 – imunoglobulina G 1

IgG 4 – imunoglobulina G 4

IL – interleucinas

IQR – intervalo interquartil

ITI – indução de imunotolerância

IV – intravenoso

LES – lúpus eritematoso sistêmico

LT- β – linfotoxina beta

mg/kg – miligrama por quilo

mTOR – proteína alvo da rampamicina em mamíferos

NK – célula natural *killer*

MHC – complexo de histocompatibilidade maior

PBMC – células mononucleares de sangue periférico

pdFVIII – concentrado de fator VIII derivado de plasma

PMA – acetato de miristato de forbol

RC – remissão completa

rFVIII – concentrado de fator VIII recombinante

rpFVIII – fator VIII recombinante porcino

SCID – imunodeficiência combinada grave

SHIP-1 – *inositol*-fosfatase contendo domínio SH2

TACI – ativador transmembrana e interator do CAML (*transmembrane activator and Calcium modulating ligand [CAML] interactor*)

TCR – receptor de células T

Th – linfócito T efetor/auxiliar (*helper*)

Tfh – linfócito T folicular

TGF- β – fator de crescimento transformador beta

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

TNFSF – superfamília do TNF

Treg – linfócito T regulador

UB/mL – unidades de Bethesda por mililitro

UI/dL – unidades internacionais por decilitro

VO – via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Epidemiologia da hemofilia A adquirida	22
1.2. Sinais clínicos da HAA	24
1.3. Diagnóstico da HAA	25
1.4. Tratamento da HAA	26
1.4.1. Controle dos sangramentos: uso de agentes <i>bypassing</i>	27
1.4.2. Fármacos imunossupressores	28
1.5. O sistema imune e a autoimunidade	31
1.5.1. Ativação das células T CD4+	32
1.5.2. Resposta das células Th1, Th2 e Th17	35
1.6. Desregulação da imunidade – mecanismos de autoimunidade	37
1.6.1. Quebra da tolerância imunológica	37
1.6.2. Falha na seleção negativa de linfócitos T	38
1.6.3. Autorreatividade dos linfócitos T e B	39
1.7. Autoimunidade e imunossenescência	41
1.8. Inibidores adquiridos do FVIII da coagulação	43
2. OBJETIVOS	46
2.1. Objetivos específicos	46
3. CASUÍSTICA	47
3.1. Desenho do estudo e seleção dos pacientes	47
3.2. Definições dos desfechos	47
4. METODOLOGIA	48
4.1. Coleta e preparo das células mononucleares de sangue periférico (PBMC)	48
4.2. Cultura de linfócitos e citometria de fluxo	49
4.3. Dosagem de BAFF e APRIL	49
4.4. Análises estatísticas	50
5. RESULTADOS	50
5.1. Aspectos clínicos e epidemiológicos	50

5.1.1. Acompanhamento longitudinal de um paciente com várias recaídas durante o tratamento (paciente 8)	57
5.1.2. Acompanhamento longitudinal de uma das pacientes que falharam ao tratamento (paciente 16).....	59
5.2. Detalhamento do perfil de citocinas observado durante o estudo	61
5.2.1. Resposta das células efectoras Th17 e Treg	61
5.2.2. Resposta das células efectoras T foliculares (Tfh) e/ou Th2.....	64
5.2.3. Resposta das células efectoras Th1.....	66
5.2.4. Resposta dos linfócitos B CD19+	68
5.2.5. Análise da produção de citocinas de acordo com a etiologia	70
5.2.6. Análises de correlação entre imunoglobulinas e perfil das citocinas	72
6. DISCUSSÃO.....	74
7. CONCLUSÕES.....	82
8. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA DA ALUNA DURANTE A PÓS-GRADUAÇÃO.	83
8.1 Relativa à tese.....	83
8.1.1. Apresentação de trabalhos em congressos.....	83
8.2 Geral.....	84
8.2.1. Artigos científicos.....	84
8.2.2. Apresentação de trabalhos e palestras em congressos	84
8.2.3. Artigos em fase de revisão para submissão	86
9 REFERÊNCIAS	87

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia da hemofilia A adquirida

A hemofilia A adquirida (HAA) é uma rara doença autoimune que resulta em graves episódios de sangramentos. A doença é causada pela produção de autoanticorpos, que por razões pouco conhecidas (e que serão discutidas posteriormente), passam a neutralizar epítomos funcionais do fator VIII (FVIII) da coagulação (1–4). Em virtude à baixa incidência de pacientes com HAA, que acomete aproximadamente 1,5 casos/milhão na população geral e 14,7 casos/milhão na população acima dos 85 anos (2,5), grandes estudos populacionais acabam tornando-se inviáveis – principalmente devido ao longo tempo para conseguir incluir participantes elegíveis, e pelo alto valor a ser investido em estudos que geralmente são longos. Por essa razão, pouquíssimo se sabe sobre os mecanismos imunológicos e fisiopatológicos que podem ser responsáveis pelo aparecimento da doença.

Ao observar as principais características da HAA e comparar sua patogênese com a hemofilia A congênita (HA), é possível notar que embora ambas as variações de hemofilia sejam caracterizadas pelo prejuízo da coagulação devido a função afetada do FVIII da coagulação, as propriedades epidemiológicas, biológicas e clínicas da HAA e da HA são distintas. As principais diferenças estão sumarizadas adiante e podem ser observadas na tabela 1.

A fisiopatologia da HAA ainda é pouco conhecida, mas sabe-se que a inativação do FVIII da coagulação ocorre por mecanismos imunológicos, que não estão associados a fatores moleculares capazes de alterar a estrutura da proteína (6,7).

Por outro lado, a HA se manifesta devido a mutações que podem levar a alterações estruturais na molécula do FVIII, causando ausência ou diminuição na produção de FVIII. Por ser uma doença congênita e ligada ao cromossomo X, a HA é incomum em indivíduos do sexo feminino, e é possível observar a manifestação dos sintomas clínicos logo na infância.

No caso da HAA observa-se uma incidência semelhante em homens e mulheres e usualmente acomete idosos, com uma idade média de 75 anos (3,8,9).

Normalmente, quanto mais idoso, mais frequente é o surgimento da doença, e mais severas são as manifestações, o que requer maior cuidado e atenção durante o tratamento (5,10). Entretanto, vale salientar que a HAA não é restrita aos idosos e pode se manifestar em indivíduos de qualquer idade, havendo um pico de ocorrência em mulheres gestantes e no período de puerpério (11), e é mais incomum em crianças e adolescentes, onde a incidência anual é de 0,0045/milhão de habitantes (12).

Tabela 1. Comparação entre a fisiopatologia da HAA e da HA¹

	Hemofilia A adquirida (HAA)	Inibidor na Hemofilia A (HA)
Alvo	FVIII endógeno (autoanticorpos)	FVIII exógeno (terapêutico) (aloanticorpos)
Idade (primeiras manifestações clínicas)	Mais comum em idosos	Aparecimento em crianças
Fatores desencadeantes	Sem predisposição genética. Afeta homens e mulheres igualmente.	Herança ligada ao cromossomo X, sendo mais comum em homens.
Características dos inibidores	Normalmente cinética do tipo 2 (sem correlação entre o nível residual de inibidor e FVIII)	Normalmente cinética do tipo 1 (inativação do FVIII concentração-dependente)
Tipo de Ig	Usualmente IgG1 e IgG4, e raramente IgA ou IgM	IgG1 e IgG4
Perfil de sangramento	Sangramentos espontâneos ocorrem normalmente com FVIII < 5% Hematomas Sangramento mucocutâneo e muscular	Sangramentos espontâneos severos normalmente com níveis de FVIII < 1%. Hemartroses Sangramento nas articulações
Sobrevida	Alto índice de mortalidade	Índice de mortalidade diminuiu com as opções de tratamento

A maioria dos pacientes com HAA manifestam a doença por causas desconhecidas (fatores idiopáticos, > 60%), mas também são reportados casos em

¹ Tabela adaptada de Webert, 2012 e Coppola et al., 2012.

que a HAA é desencadeada secundariamente a condições como neoplasias (aproximadamente em 20% dos casos), doenças autoimunes (como por exemplo: lúpus eritematoso sistêmico [LES], síndrome de Sjögren, artrite reumatoide – que atinge aproximadamente em 15%), infecções virais (como hepatites e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana [HIV], em até 10%) e ainda podem estar relacionadas à gestação ou ao uso de determinados medicamentos (3,13,14).

1.2. Sinais clínicos da HAA

Embora tanto a HAA e quanto a HA possam manifestar sangramentos espontâneos ou induzidos por trauma, o perfil de sangramento nos pacientes é diferente. A classificação da HA congênita baseia-se na atividade de FVIII residual, onde valores < 1 unidade internacional por decilitros (UI/dL) caracterizam a HA grave, valores de 1-5 UI/dL correspondem a HA moderada, e 5-40 UI/dL indicam HA leve (15). Quanto maior a gravidade da HA, mais frequente e intensa é a manifestação dos episódios hemorrágicos, o que impacta na frequência da necessidade de intervenção terapêutica, que inclui a utilização de concentrados de FVIII, como os derivados de plasma (pdFVIII) ou recombinantes (rFVIII). Os concentrados de FVIII são produtos utilizados com o potencial de restaurar a função da hemostasia comprometida na HA e previne ou controla as manifestações hemorrágicas (16). A estrutura do FVIII é altamente imunogênica, e as infusões de concentrados de FVIII em pacientes com HA podem desencadear o desenvolvimento de aloanticorpos contra o FVIII (inibidores), o que é observado em até 30% dos pacientes com HA severa (15,17,18).

Pacientes com HA grave apresentam sangramentos espontâneos e recorrentes nas articulações com comum aparecimento de hemartroses, hemorragias musculares e em cavidades (15,19). O perfil de sangramento na HAA é independente da atividade do FVIII e podem ser quadros hemorrágicos graves (20–22). Pacientes com HAA apresentam extensos hematomas, com sangramento predominantemente subcutâneo (> 80%) seguido por sangramentos musculares (> 40%), e em menor incidência sangramentos no trato gastrointestinal/retroperitoneal

(<10%). Diferentemente da HA, sangramentos articulares são pouco frequentes (20).

1.2.1. Diagnóstico da HAA

O diagnóstico da HAA ocorre normalmente em indivíduos que não apresentam histórico prévio ou familiar de sangramento, e deve ser realizado associando a evolução clínica e os dados laboratoriais do paciente. Por ser uma doença rara, muitas vezes é subdiagnosticada e, portanto, o diagnóstico diferencial deve ser realizado com muita cautela, e os profissionais devem ser treinados e adequadamente preparados para identificar a presença da doença. A demora no diagnóstico correto impacta no atraso do início do tratamento e prejuízo na resposta, como observado no estudo EACH2 (3), o que aumenta a taxa de mortalidade decorrente da patologia.

Os testes laboratoriais utilizados associam o sangramento anormal a um prolongamento no tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), e baixa atividade do FVIII (FVIII:C). O TTPa é utilizado como teste de triagem, e apresenta algumas desvantagens, incluindo a alta taxa de variabilidade e imprecisão observada na execução da técnica (8,23).

Uma técnica que pode ser utilizada para auxiliar a confirmação do diagnóstico é o teste de mistura, que é utilizada principalmente em locais onde não é possível realizar o ensaio de Bethesda. O objetivo desse teste é identificar a presença de inibidores ao misturar o plasma do paciente com uma outra fonte de FVIII (como por exemplo o *pool* de plasma de indivíduos saudáveis). A normalização dos valores do TTPa após a leitura do teste é sugestiva de que o plasma normal tenha fornecido o fator necessário para ativação da coagulação, e indica deficiência de fator. Contudo, em situações em que o teste de mistura não é suficiente para normalizar os valores do TTPa, o resultado é um indicativo de que exista a presença de inibidores que estão inativando a atividade do fator de coagulação (1,24). Para garantir a eficiência da interpretação do resultado, deve-se descartar o uso de anticoagulantes ou a presença de anticoagulante lúpico.

A confirmação definitiva do diagnóstico de HAA pode ser realizada pelo ensaio de Bethesda (BA, Bethesda assay) ou por uma de suas modificações, como Nijmegen, que melhorara a sensibilidade do teste ao tamponar o *pool* de plasma normal ao substituir o imidazol por um plasma deficiente livre de inibidores (8,23,25). Esse ensaio avalia indiretamente a quantidade residual de FVIII após a ação do anticorpo neutralizante anti-FVIII. O anticorpo produzido é quantificado por meio da titulação do anticorpo e avaliação do efeito do anticorpo em uma fonte estável de FVIII. Após um período de incubação é determinada a atividade residual do fator VIII:C, preferencialmente pelo método cromogênico (23). Portanto, pelo método Bethesda é possível estabelecer a correlação entre a atividade do FVIII residual e o título de inibidor. Por definição, a unidade de Bethesda (BU) é a unidade de medida que corresponde à quantidade de inibidor capaz de neutralizar 50% da atividade do FVIII por mililitro. O paciente recebe diagnóstico de HAA quando a atividade do FVIII é menor do que 50% e o título de inibidor é maior de 0,6UB por mililitro (UB/mL) (8).

1.3. Tratamento da HAA

Indivíduos com HAA devem ser tratados o mais rápido possível para evitar maiores complicações decorrente aos episódios de sangramento. Devido a gravidade dos sangramentos e as complicações que podem ser observadas, indivíduos diagnosticados com HAA devem ser tratados em centros especializados, e que possuam pessoal capacitado (21).

A conduta clínica deve ter dois objetivos primordiais, (1) reestabelecer a hemostasia e controlar qualquer sangramento presente, e (2) erradicar a presença do inibidor com o uso de medicamentos imunossupressores. As principais terapias farmacológicas utilizadas na HAA são descritas a seguir e ilustradas na Figura 1.

1.3.1. Controle dos sangramentos: uso de agentes *bypassing*

O atual tratamento para a HAA é baseado em diretrizes internacionais publicadas por Tiede e colaboradores em 2020 (8). Sangramentos que são clinicamente relevantes devem ser tratados com agentes *bypassing*. Os agentes utilizados incluem o fator VII ativado recombinante (rFVIIa) e o complexo protrombínico ativado (CPPa). Nenhum estudo comparativo demonstrou diferenças entre a efetividade do rFVIIa e do CPPa, e ambos são altamente efetivos para tratar os sangramentos, portanto a escolha do agente a ser utilizado dependerá da disponibilidade e experiência local (8,26,27). Usualmente, esses agentes são indicados para sangramentos agudos, mas também podem ser utilizados como profiláticos em caso de procedimentos invasivos (Nogami et al., 2018).

O rFVIIa age diretamente a outros fatores de coagulação, como o FX, e promove a conversão do FX em FXa, induzindo a geração de trombina. O rFVIIa também pode se ligar ao receptor da proteína C endotelial (EPCR), e ativar diretamente o FX, contribuindo para a expansão da produção de trombina. O aumento de trombina ocorre após ativação do FX e de outros fatores de coagulação que se ligam à superfície da membrana das plaquetas. (28). O CPPa possui os fatores da coagulação dependentes da vitamina K (protrombina, FVII, FVIIa, FIX, FIXa e FX), onde parte deles estão parcialmente ativados e facilitando a produção de trombina (29).

Pacientes que apresentam título de inibidor acima de 5 UB/mL (> 5 UB/mL) são considerados pacientes com alto título de inibidor. O título aumentado é capaz de inativar rapidamente o FVIII presente na circulação, e os concentrados de FVIII são ineficazes. Como alternativa é possível utilizar os concentrados de agentes de *bypassing*, no entanto, esses produtos nem sempre são eficazes. Nesses casos, também pode ser utilizado o FVIII recombinante porcino (rpFVIII), que apresenta uma boa resposta no controle hemostático desses pacientes (30). Embora o rpFVIII não seja utilizado no Brasil, é importante salientar que as diretrizes internacionais recomendam que antes da utilização desse fator, os títulos de inibidor porcino sejam testados. O teste é executado pelo mesmo princípio do ensaio de Bethesda, utilizando reagentes específicos para a amostra testada (8).

Mais recentemente, estudos tem apontado para benefícios do uso do emicizumabe na HAA. O emicizumabe é anticorpo biespecífico que mimetiza o FVIII, capaz de reduzir consideravelmente as taxas de sangramentos na HA, sendo indicado para o tratamento profilático de pacientes com ou sem inibidor (27). Embora não seja utilizado com frequência no Brasil, por não ser aprovado pelo SUS para tratamento de HAA, e possuir custo elevado (o que torna a adesão ao tratamento inviável), ele é utilizado *off-label* para tratamento da HAA em inúmeros países, incluindo os Estados Unidos e o Reino Unido, e já está aprovado no Japão inclusive para essa finalidade (27,31,32).

A utilização do emicizumabe na HAA parece ter algumas vantagens, considerando os possíveis efeitos no tratamento da doença, incluindo a prevenção de sangramentos espontâneos, aplicações subcutâneas em intervalos longos, possibilitando o tratamento ambulatorial de pacientes, além de permitir que tratamentos imunossupressores sejam realizados de forma mais branda e com menor intensidade (3). Um estudo revisou 73 relatos de caso que utilizaram emicizumabe como profilático na HAA, e os resultados demonstraram que a medicação é promissora e apresenta eficácia em prevenir sangramentos, sugerindo que após mais pesquisas, o fármaco possa ser utilizado como segunda linha de tratamento para prevenir sangramentos agudos em pacientes que ainda não erradicaram o inibidor (33). Contudo, vale ressaltar que estudos maiores precisam ser conduzidos para monitorar cuidadosamente quais são os possíveis eventos adversos e complicações (como AVC, por exemplo), a fim de mensurar a verdadeira relação entre a segurança e eficácia do protocolo (32).

1.3.2. Fármacos imunossupressores

A imunossupressão é utilizada para erradicar os níveis de inibidores, e tem como objetivo reduzir o risco de sangramento, além de diminuir o tempo para se alcançar a remissão completa. Como grande parcela da casuística da HAA é composta por pacientes idosos ou que possui outra patologia de base (como neoplasias ou doenças autoimunes), a imunossupressão deve ser realizada com cautela, já que os efeitos colaterais dos imunossupressores são perigosos e

potencialmente fatais (34). A imunossupressão causa efeitos colaterais em mais de 37% dos pacientes, e a taxa de mortalidade é mais alta em indivíduos mais idosos com comorbidades. Dentre os efeitos reportados, podemos destacar leucopenia, infecções severas, trombocitopenia, e diabetes induzida por glicocorticoides (35).

Embora os protocolos de tratamento possam variar de acordo com o estudo e centro de tratamento, a recomendação mais recente (2020) propõe que pacientes com HAA que possuem níveis de FVIII $\geq 1\%$ e título de inibidor ≤ 20 UB/mL façam uso de esteroides por um período de 3 a 4 semanas (prednisona 1mg/kg/dia), sem associação de outros fármacos, e em casos de não-resposta, seja adicionado ciclofosfamida (1-2 mg/kg/dia) ou rituximabe (375mg/m² por semana). Por outro lado, para pacientes que possuem os níveis de FVIII $< 1\%$ ou título de inibidor > 20 UB/mL, seja utilizado como primeira linha a administração conjunta de esteroides associado de ciclofosfamida ou rituximabe pelo período de 3 a 4 semanas (8). Outros agentes imunossupressores também podem ser utilizados quando o paciente não responde as terapias padronizadas, incluindo azatrioprina, ciclosporina ou vincristina (21).

Os imunossupressores, como glicocorticoides (prednisona) e a ciclofosfamida, são capazes de modular a ação e resposta dos linfócitos. Os glicocorticoides diminuem a maturação e atenuam a resposta das células dendríticas ao diminuir a expressão do MHC-II (complexo principal de histocompatibilidade). Além disso, diminuem a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e TNF, e aumentam a expressão de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10. Na imunidade adaptativa, são capazes de inibir sinais de coestimulação, reduzir a ativação do receptor de célula T (TCR) e a sobrevivência de linfócitos (suprimem a resposta de células Th1 e Th17 e estimulam a função de células Th2 e T regulatórias) (36).

A ciclofosfamida é um fármaco quimioterápico alquilante de DNA utilizado no tratamento de diferentes neoplasias. Doses altas (> 200 mg/kg ou > 750 mg/m²) podem causar depleção geral de linfócitos e são administradas em protocolos de tratamento para LES ou em transplante de medula óssea (37,38). Baixas doses (1-3mg/kg) podem ser utilizadas em protocolos de neoplasias e é preconizado no tratamento da HAA. Ao diminuir a dosagem utilizada o fármaco passa a ser mais bem tolerado, e os efeitos adversos são reduzidos significativamente. As células T

regulatórias (Tregs) são depletadas seletivamente e têm sua função atenuada quando a administração de ciclofosfamida ocorre em doses baixas. Estudos demonstram que esse efeito pode decorrer da diminuição da expressão de FoxP3, que é um importante fator de transcrição (FTr) de células Tregs (39). Outro gene inibido é o gene da superfamília do TNF-induzido por glicocorticoide, que age como uma molécula coestimulatória que induz a proliferação de Tregs (40). Embora as células Treg tenham um papel importante ao auxiliar a diminuir a resposta autoimune, a ciclofosfamida possui maior efeito nas células B e nas células T efectoras, e estudos demonstram que os efeitos na depleção de células B é mais rápido do que o efeito observado nas células Tregs (41,42). É interessante notar, que a função de outras células T efectoras é aumentada, e que a secreção de citocinas é alterada de um perfil Th2 para um perfil Th1, com o aumento da secreção de interferon do tipo 1 e IL-2. As células Th1 possuem o potencial de aumentar a proliferação de células T citotóxicas (TCD8⁺), que são essenciais para a lise tumoral (39).

Além do rituximabe, que é um anticorpo monoclonal direcionado para células CD20, outros fármacos são utilizados como potenciais alvos terapêuticos em pacientes com HAA, sobretudo casos que apresentam muita dificuldade na erradicação do inibidor. Recentemente, alguns relatos de caso têm descrito a utilização do bortezomibe *off-label* em casos refratários.

O bortezomibe é um fármaco quimioterápico que tem sido estudado como uma opção terapêutica promissora em doenças autoimunes que são mediadas pela produção de autoanticorpos, principalmente por apresentar efeitos citotóxicos diretos em plasmócitos alterados, e atua diretamente na imunidade humoral ao reduzir a proliferação de células B ativas ao diminuir a capacidade dos linfócitos B iniciarem as respostas mediadas por anticorpos. Poucos estudos recentes têm associado protocolo de bortezomibe para pacientes com HAA resistente e secundária a mieloma múltiplo, apresentando resultados satisfatórios, e sugerindo uma nova abordagem terapêutica a ser estudada para tratamento de pacientes com HAA (43,44).

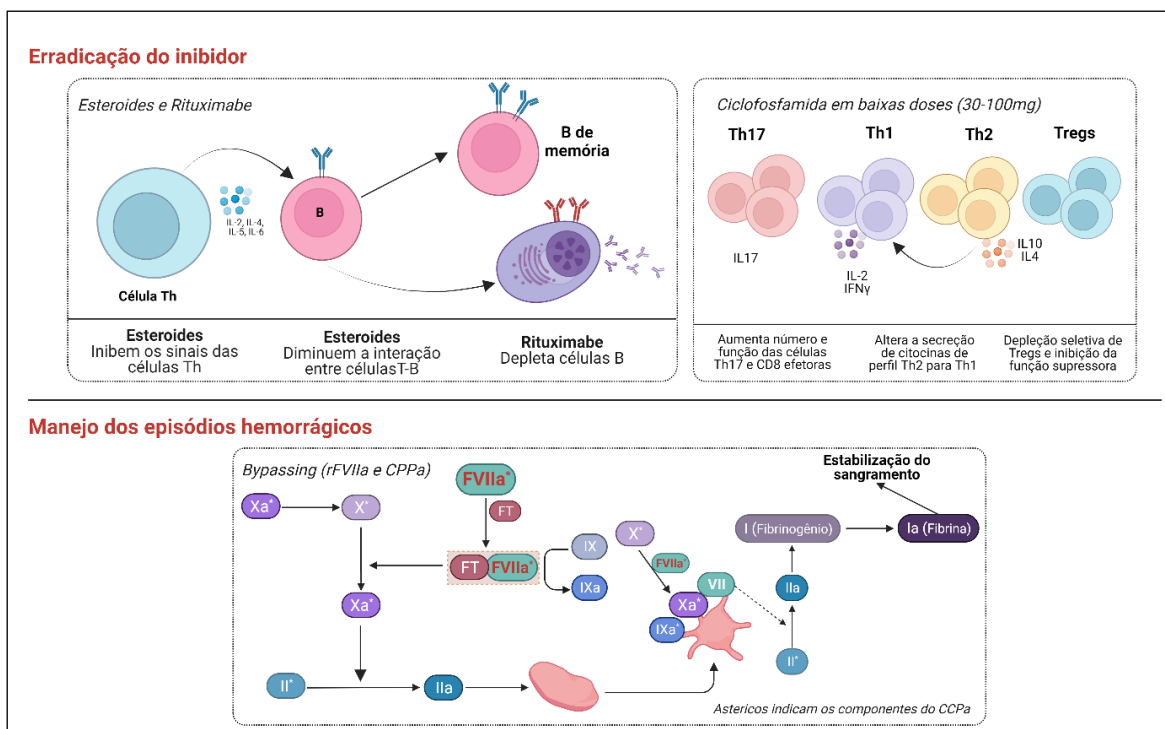


Figura 1. Principais terapias utilizadas no tratamento da HAA. A erradicação do inibidor é realizada pela imunossupressão mediada por esteroides, rituximabe e/ou ciclofosfamida. Corticosteroides agem modulando a resposta imunológica ao inibir os sinais emitidos pelas células T auxiliares (Th) e, portanto, diminuem as interações entre células T e B, diminuindo a ativação das células B. O rituximabe é um anticorpo monoclonal quimérico que age depletando células CD20⁺, inibindo a quantidade circulante de células secretoras de anticorpos. O quadro superior direito demonstra quais são os efeitos imunossupressores observados no uso da ciclofosfamida em baixas concentrações (30-100mg/dia). A ciclofosfamida age depletando as células T regulatórias seletivamente, e inibindo sua função supressora. Além disso, é capaz de alterar o perfil de citocinas secretadas pelos linfócitos, de Th2 para Th1, e aumentar a expressão de células Th17 e células CD8 efetoras. Quando necessário, o manejo dos episódios hemorrágicos é realizado pelo uso de agentes *bypassing*. O quadro inferior ilustra os locais de ação do rFVIIa. O rFVIIa age ao se ligar ao fator tecidual (FT), e ao FX em FXa. O FXa promove a conversão de protrombina (FII) em trombina (FIIa). A ação também é dependente das plaquetas, que são ativadas pelos zimogênios na forma ativa (FXa, FII) e auxiliam na amplificação da liberação de trombina. A trombina, por sua vez converte o fibrinogênio (FI) em fibrina (FIa), estabilizando o sangramento. Figura elaborada com Biorender.com.

1.4. O sistema imune e a autoimunidade

O sistema imunológico possui uma complexa maquinaria que trabalha continuamente para garantir a homeostasia do organismo. Embora o sistema hemostático também tenha interrelação com o sistema imune, esse mecanismo não está envolvido diretamente nos processos de autoimunidade. Para fins didáticos, a resposta imunológica é subdividida em imunidade inata e adaptativa. A resposta

imune inata consiste nos mecanismos que ativam as primeiras linhas de defesa, incluindo as barreiras física (como as barreiras epiteliais) e células que normalmente são conhecidas como fagócitos, incluindo as células dendríticas, macrófagos, células natural-killer (NK), mastócitos, basófilos e eosinófilos (45). Além disso, as plaquetas, além de mediadores primários da hemostasia, habilidade em se comunicar com o sistema imune inato e adaptativo (46). A imunidade inata é pouco seletiva, e possui mecanismos de defesa que respondem a invasores com a mesma intensidade e seletividade, independente de um contato prévio ou não. Já a imunidade adaptativa possui um papel mais específico na resposta a agentes invasores, com mecanismos altamente seletivos, que são capazes de responder com maior rapidez e precisão quando em um contato secundário, via ativação de células de memória.

As respostas da imunidade adaptativa são conduzidas pelos linfócitos T e B, e podem ser classificadas em imunidade celular e humoral. A imunidade celular consiste na produção e secreção de proteínas com capacidade de afetar o comportamento de outras células, conhecidas como citocinas. Por sua vez, a imunidade humoral é mediada pela secreção de anticorpos, que são capazes de inativar os agentes invasores por uma gama diferente de mecanismos que são executados em conjunto de funções e células da imunidade inata (47). Esses mecanismos incluem a neutralização do agente infeccioso, ativação do sistema complemento, promoção da opsonização via fagócitos (da imunidade inata) e promoção da citotoxicidade celular dependente de anticorpos (48).

Embora a resposta imune seja dividida em tantas facetas, os mecanismos que regem o comportamento do sistema imunológico se comportam de forma coordenada, contribuindo para o reparo do ambiente prejudicado (49).

1.4.1. Ativação das células T CD4⁺

Os linfócitos T CD4⁺ se desenvolvem e maturam no timo antes de serem liberados para a circulação como células T virgens (*naïve*, ou Th0). As células Th0 se encontram em um estado quiescente (G0 do ciclo celular) onde suas atividades metabólicas e transcricionais permanecem baixas (50), e o destino da ativação

celular dependerá de inúmeros fatores estabelecidos pelo microambiente, incluindo sinais imunológicos, atividade de fatores de crescimento, nutrientes, oxigênio e metabólitos bioativos. A proteína alvo da rampamicina em mamíferos (mTOR), por exemplo, é um dos principais reguladores da saída do estado de quiescência das células Th0, e determinará, juntamente com outros fatores de transcrição se a ativação levará essas células a expansão de células T de memória, células Tregs ou células T efetoras (51,52). A transição de quiescência (Th0) para ativação dependerá de algumas etapas distintas, incluindo a entrada na fase G2 do ciclo celular, crescimento celular, maior absorção de nutrientes, reprogramação do metabolismo das mitocôndrias, e liberação parácrina ou autócrina de IL-2 (50).

A principal ponte entre a imunidade inata e adaptativa ocorre quando as células apresentadoras de antígeno (do inglês *antigen presenting cells*, APCs) – como as células dendríticas – são capazes de apresentar peptídeos específicos aos linfócitos T, e as células Th0 saem do estado de quiescência e são ativadas por processos de seleção e expansão clonal (53). A apresentação dos antígenos ocorre pela interação entre o complexo de histocompatibilidade maior (MHC-II) das APCs com TCR. A diversificação dos subtipos de linfócitos dependerá de duas fases de ativação, incluindo o reconhecimento e indução e a fase de reforço ou diferenciação final, como esquematizado na figura 2 (54).

A primeira fase de ativação também é conhecida como fase de reconhecimento ou de indução (no inglês é denominada como *priming*). Durante essa fase, células Th0 recebem sinais de ativação do TCR com o MHC-II, e dependem da coestimulação com outras proteínas da membrana da célula T com a APC. A coestimulação ocorre pela ligação de moléculas cognatas, como o CD28 da célula T e CD80 ou CD86 da célula APC (55), e desencadeia um terceiro sinal de ativação que irá influenciar a decisão de qual subtipo de linfócito será diferenciado, que ocorre pela produção de fatores de transcrição e citocinas específicas para o desenvolvimento do subtipo celular em questão, que serão discutidos mais adiante (52).

Na segunda fase de ativação ocorre o reforço, ou diferenciação terminal. Nessa etapa, os sinais emitidos pelo TCR irão determinar se o clone que foi diferenciado irá ser uma célula CD4⁺ efetora produtora de citocinas com diferentes funções na resposta imune (células Th1, Th2 ou Th17), uma célula Tregs ou uma

célula T folicular (Tfh), que possui como principal papel atuar no auxílio da ativação das células B, e indução da produção de anticorpos de acordo com o perfil da resposta produzida pelas células Th1, Th2 ou Th17 (53,56). Dentre os aspectos que diferenciam as células Th efetoras e Tfh está a produção do fator de transcrição BCL-6 pelas células Tfh e Blimp-1 pelas células Th efetoras (57).

As células de memória possuem um papel essencial na defesa contra patógenos. Elas facilitam o processo de vigilância nos órgãos linfoides primários e na periferia, e são capazes de promover uma resposta robusta ao encontrar com antígenos cognatos em um segundo momento. Ao encontrar um agente invasor, as células de memória exibem funções efetoras e passam a produzir citocinas quando ativadas (58).

Os linfócitos Th secretam uma gama diferente de citocinas, que irão promover a resposta específica. Dentre as funções específicas das citocinas, está a contribuição no processo de ativação dos linfócitos B, maturação das células B em plasmócitos e secreção de imunoglobulinas (Igs) (59).

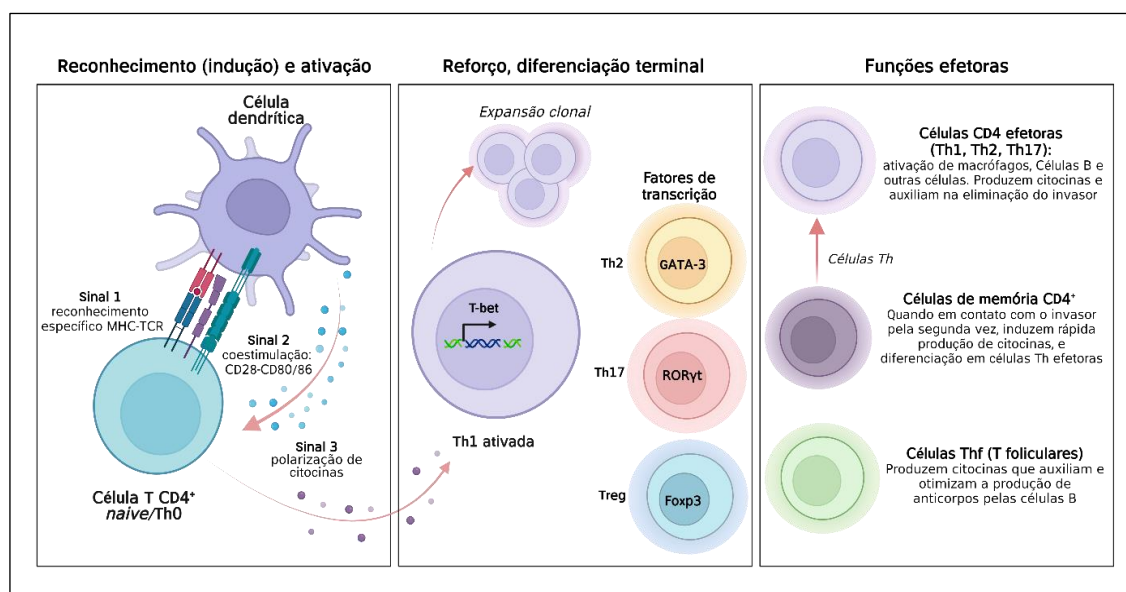


Figura 2. Ativação de células T CD4 em suas funções efetoras. A primeira etapa da ativação das células TCD4+ é o reconhecimento do antígeno. As mensagens enviadas pelas citocinas (sinal 3) influenciam na decisão de qual subtipo de linfócito será produzido pelo clone ativado. Durante a diferenciação terminal, o fator de transcrição expresso via a indução das citocinas ativadas no Sinal 3 e a intensidade do sinal emitido pelo TCR darão origem a um subtipo de linfócito diferente (sinais mais intensos do TCR, por exemplo, podem levar à produção de FT como T-bet, IRF4, STAT5, etc., que serão responsáveis pelo subtipo de linfócito qual a expansão clonal ocorrerá; sinais mais fracos podem induzir a produção de FT como BCL6, CXCR5, que são essenciais para a produção das células Tfh). Figura elaborada com Biorender.com.

1.4.2. Resposta das células Th1, Th2 e Th17

As células T auxiliares ao serem ativadas podem se diferenciar em subtipos diferentes de células Th. Os subtipos mais bem estabelecidos pela literatura compreendem as células Th1, Th2 e Th17 (Figura 3), contudo existem outros subtipos também têm sido reportados, como as células Th9 ou Th22 (60). A diferenciação depende da interação cognata ente o antígeno específico apresentado pelo MHC-II com o TCR da célula Th0. Cada subtipo é dividido de acordo com sua capacidade de expressar fatores de transcrição e secretar citocinas específicas que agem contra classes diferentes de invasores (52).

Os clones Th1 são os principais participantes na defesa de patógenos como bactérias e vírus. O principal fator de transcrição que é responsável pela diferenciação em células Th1 é o T-bet, e as citocinas clássicas secretadas incluem a citocinas pró-inflamatória IFN- γ e a IL-2. A estimulação do TCR e a sinalização IFN- γ -STAT1 auxiliam na indução da produção de T-bet, que ao induzir a diferenciação de Th1, suprime as linhagens Th2 e Th17. Além disso, T-bet se liga ao gene *Ifng*, aumentando a expressão de IFN- γ e promovendo a expressão de IL-12, que é uma citocina importante, pois contribui para a diferenciação das células Th1, por ser capaz de manter o T-bet expresso (45).

Células Th2 atuam contra a invasão de parasitos, helmintos, e contribuem para o reparo tecidual e para a inflamação crônica em doenças como asma ou alergias. Essas células expressam o TF GATA3 via indução de IL-4 (secretada por células dendríticas) e via fosforilação da proteína STAT6, que induz a produção das citocinas clássicas, IL-4, IL-5 e IL-13. Além disso, as células Th2 são descritas por estarem envolvidas na produção de anticorpos via produção de IL-4, e podem atuar na troca de subclasse para IgG4 (53,61,62). Atualmente, estudos demonstram que a secreção de citocinas que induzem a produção e secreção de anticorpos pelas células B não é canônica de célula Th2, e que as células Tfh podem produzir citocinas que auxiliam a mediação da resposta humoral, de modo dependente ou independente das células Th1/Th2 (63).

As células Th17 foram descritas pela primeira vez em 2005, como um subtipo celular responsável pela destruição de invasores que não eram eliminados apropriadamente pelas células Th1 ou Th2 (60), e posteriormente foi estabelecido

o papel das células Th17 na indução da inflamação e na patogênese de diferentes doenças autoimunes (61). Essas células possuem como marcadores clássicos o fator de transcrição ROR γ t, e secretam as citocinas IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 (53,55,61). A diferenciação inapropriada de células Th pode resultar não apenas em infecções crônicas, como também em diversas formas de alergias e doenças autoimunes, e muitos estudos envolvendo doenças autoimunes relacionam os efeitos das células Th17 na fisiopatologia dessas doenças (58).

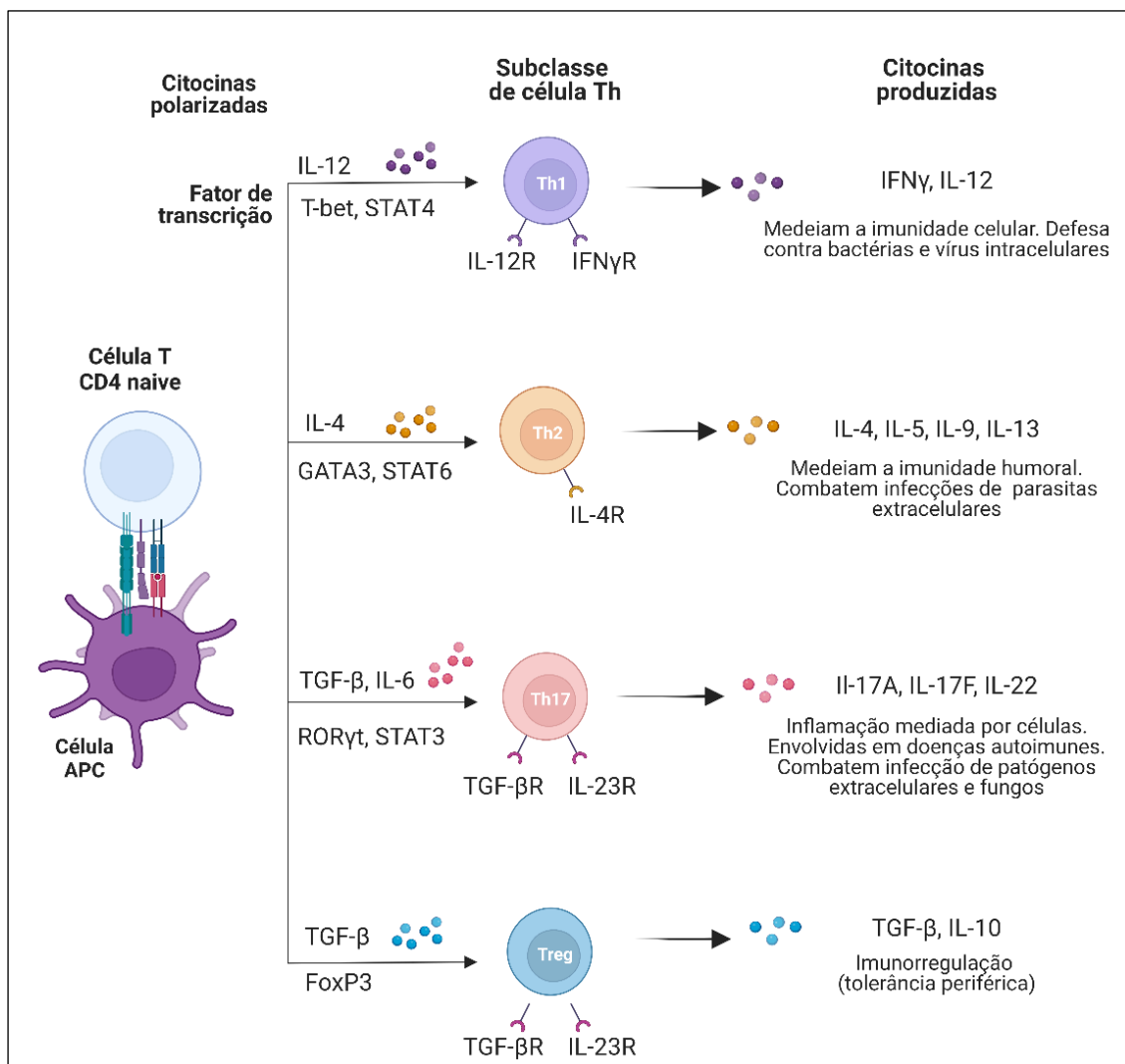


Figura 3. Subtipos das células T auxiliares e perfil de citocinas produzido. Células T auxiliares se diferenciam em subtipos de linfócitos T de acordo com a produção de citocinas polarizadas no contato com a célula APC e a célula Th0 (T *naïve*). Imagem adaptada de (64). FoxP3, Caixa de Forquilha P3; IFN, interferon; IL, interleucina; ROR, receptor órfão relacionado ao retinóide; TGF, fator transformador de crescimento; Th, T auxiliar; TNF, fator de necrose tumoral; Treg, T regulatória. Figura elaborada com Biorender.com.

1.5. Desregulação da imunidade – mecanismos de autoimunidade

Quando a ativação das células imunes não ocorre de maneira apropriada, observa-se a manifestação de respostas indesejáveis, como exacerbação de processos inflamatórios já presentes no ambiente e a indução de respostas autoimunes (65,66).

A complexidade da fisiopatologia da autoimunidade demanda inúmeros e detalhados estudos que se baseiam em mecanismos específicos que podem estar relacionados com a evolução do processo patológico. Os fatores que podem interferir na manifestação da autoimunidade incluem exposição repetida a infecções, exposição ambiental e aspectos (67,68). A literatura demonstra que as manifestações autoimunes e os processos de autoimunidade podem ser desencadeados por diferentes razões, listadas a seguir.

1.5.1. Quebra da tolerância imunológica

A tolerância imunológica consiste na capacidade que o organismo possui em encontrar moléculas próprias (como por exemplo o FVIII) e não responder a elas. Os mecanismos de ativação da tolerância imunológica ocorrem nos órgãos linfoides centrais ou periféricos, em vários estágios de desenvolvimento dos linfócitos. A ativação excessiva da tolerância pode resultar em infecções, e até mesmo em câncer. Por outro lado, a quebra da tolerância imunológica pode desencadear doenças autoimunes (69).

A tolerância só é completa após os mecanismos periféricos serem ativados, já que nem todos os antígenos são adequadamente apresentados no timo. Esses mecanismos compreendem a deleção de células que escaparam da seleção negativa, ou a supressão da resposta por células Tregs, ou indução de anergia, que consiste na não-responsividade funcional das células T (70).

Um exemplo de mecanismo que estimula a tolerância é o estímulo produzido por moléculas coinibitoras como o CTLA-4 (conhecido como antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos) que reprime o segundo sinal de ativação dos linfócitos e

induz a quiescência das células T por diferentes mecanismos, incluindo a competição entre o CD28 pela ligação em CD80/CD86 (50,55,71).

Autoantígenos que não são expressos nos tecidos linfoides primários, podem ser encontrados na periferia e induzir as células autorreativas a um estado de não responsividade, conhecido como anergia (49). Linfócitos em estado de anergia não são capazes de ativar a citocina NF- κ B e ficam susceptíveis a morte celular precoce (72). A deficiência de uma célula tolerogênica em ser ativada não desencadeará, necessariamente, uma doença, mas poderá contribuir para que estímulos *downstream* sejam inibidos, prejudicando a resposta inibitória dos linfócitos e contribuindo para a manifestação da autoimunidade (70).

1.5.2. Falha na seleção negativa de linfócitos T

A seleção positiva consiste em um mecanismo de tolerância central que ocorre durante a maturação dos linfócitos nos órgãos linfoides centrais (timo para linfócitos T e medula óssea para linfócitos B), onde linfócitos que interagem com intensidade moderada recebem sinais de sobrevivência e se diferenciam em linfócitos maduros. Já os linfócitos que interagem com alta intensidade com peptídeos próprios são excluídos (seleção negativa), com objetivo de eliminar células autorreativas da circulação (73). A falha na seleção negativa impede a deleção clonal de células T autorreativas, e promove a manifestação de doenças autoimunes (68).

Os mecanismos de autoimunidade descritos na literatura não são específicos para a HAA, devido à ausência de estudos que explorem detalhadamente a fisiopatologia da doença. Portanto, para ilustrar os principais mecanismos de autoimunidade que podem estar associados com a fisiopatologia da HAA, três esquemas são ilustrados na Figura 4, com base em estudos realizados com outras doenças autoimunes, como o LES, diabetes tipo 1, artrite reumatoide entre outras patologias.

1.5.3. Autorreatividade dos linfócitos T e B

Dentre os impactos da perda da tolerância imunológica, está a geração de células autorreativas. Em condições homeostáticas, as células autorreativas são reguladas por vários mecanismos diferentes até que ocorra a redução de sua frequência no repertório linfocitário; diminuição da afinidade pelo tecido próprio, ou de sua funcionalidade (74). Normalmente, durante a seleção clonal, uma grande proporção de linfócitos é destruída antes da sua maturação (> 90%), e as células autorreativas são removidas do repertório de linfócitos nos órgãos linfoides primários, principalmente por apoptose (75).

Em condições patológicas, a autorreatividade dos linfócitos pode levar a ativação descoordenada dos receptores de linfócitos T e B, que são conhecidos, como receptor de células T (TCR) e receptor de células B (BCR). Esses receptores se ligam a antígenos próprios com alta intensidade e os mecanismos de tolerância não são suficientes para inativar a resposta (76).

A autorreatividade das células B é extensamente estudada. As células B autorreativas produzem uma quantidade excessiva de anticorpos, e estão associadas com diferentes doenças autoimunes. Os linfócitos B são capazes não apenas de secretar anticorpos, como também de processar e apresentar antígenos, e entregar sinais coestimulatória para células Th0, que são ativadas em células Th1 e Th2 (77).

As células B autorreativas que escapam dos mecanismos de tolerância central são controladas por mecanismos periféricos muito semelhantes aos mecanismos de tolerância das células T, e quando uma célula B autorreativa encontra um antígeno próprio, ela recebe o estímulo do sinal 1 (interação entre peptídeo e BCR) mas ainda assim é dependente das células Th efetoras para enviar os sinais 2 e 3 e ter a resposta completa. Caso a célula Th efetora tenha sido inibida por mecanismos de tolerância de células T, a célula B não é ativada, e sofre apoptose (78).

Dependendo da presença de fatores de sobrevivência, os plasmócitos podem perdurar como células de longa-vida. Estudos realizados com outras doenças autoimunes demonstram que as células B autorreativas antígeno-específicas são muito importantes na apresentação de antígenos próprios que

ativam células T autorreativas e quebram a tolerância das células T, observadas na autoimunidade (79). A autorreatividade pode ser regulada, por exemplo, por meio de sinais de sobrevivência enviados pelas células Tfh através de várias vias de sinalização, incluindo a ativação das moléculas CD40L, IL-4, IL-21, PD1 e BAFF (63).

Embora não seja possível encontrar estudos específicos para a HAA, a literatura demonstra que a autorreatividade observada em doenças autoimunes pode ser causada pela associação de vários fatores distintos. Dentre os fatores extrínsecos que podem estar associados com a autorreatividade de células B, na HAA, podemos hipotetizar de que a realização de um *clearance* defeituoso de células apoptóticas e proteínas senescentes por macrófagos e neutrófilos pode induzir a hiper-reatividade de células Th (80) e promover alteração nas células dendríticas, além de aumentar o estímulo de citocinas como BAFF (Fator ativador de células B), IFN- γ (interferon-gama), e interleucina (IL)-21, que contribuem para a sobrevivência dessas células autorreativas (81–83).

Ademais, ao observar a fisiopatologia do desenvolvimento de anticorpos na HA, estudos trazem evidências do envolvimento das células Th na produção de anticorpos anti-FVIII ao observar de que os anticorpos inibidores sofrem hipermutação somática, e a troca de classe das Igs é um indicativo do envolvimento das células T na resposta imune anti-FVIII (77).

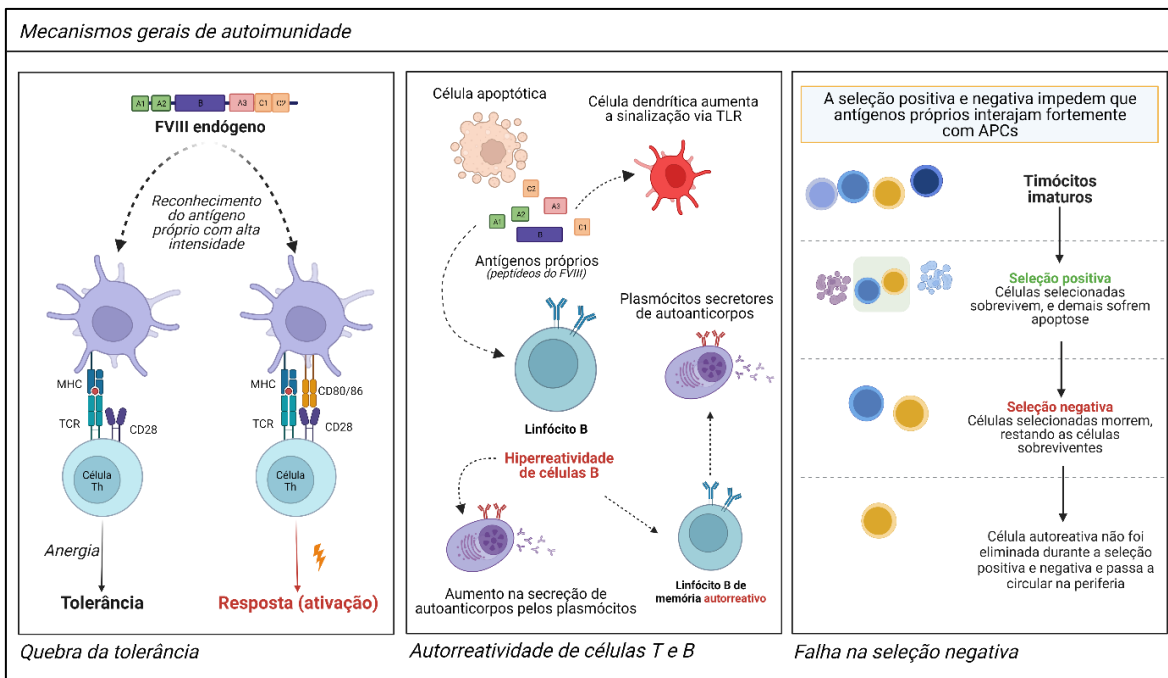


Figura 4. Mecanismos gerais de autoimunidade. Na hemofilia A adquirida (HAA), a quebra da tolerância pode ocorrer após o contato com moléculas do fator VIII (FVIII) endógeno, que passam a ser reconhecidas com alta intensidade pelas células apresentadoras de antígeno (APCs). A resposta contra esses agentes e a ativação dos linfócitos T *helper* (Th) resulta na ativação do sistema imunológico contra os peptídeos do FVIII. A autorreatividade pode estar associada de forma direta e indireta com a quebra da tolerância. O esquema representado no segundo quadro está baseado na revisão de Jin et al., 2020, que descreve como a apoptose defeituosa pode influenciar na apresentação de peptídeos próprios e indução da autorreatividade de células T e B. Os defeitos da apoptose aumentam a secreção de citocinas pró-sobrevivência, como a BAFF e o IFN- γ , que causam a hiper-reatividade das células B e secreção exacerbada de autoanticorpos pelos plasmócitos. Além disso, APCs que encontram os peptídeos próprios podem aumentar a sinalização dessas citocinas via ativação do TLR (receptor do tipo Toll). O terceiro esquema representa como ocorre o processo de falha na seleção negativa. A seleção negativa é um mecanismo que ocorre para impedir que peptídeos que interagiram com o sistema imune com alta intensidade circulem na periferia. A seleção positiva é o passo onde as células imaturas que reconhecem fracamente o APC são selecionadas para sobreviver. Na seleção negativa, peptídeos que foram apresentados e se ligaram com alta intensidade ao APC sofre apoptose. Quando os peptídeos que se ligam fortemente ao antígeno não sofrem apoptose, células autorreativas são liberadas na periferia.

1.6. Autoimunidade e imunossenescência

Os sinais de comprometimento do sistema imunológico são observados a partir dos 50 anos de idade, apresentando maior relevância e impacto clínico de modo crescente depois dos 70 anos (84). Um aspecto interessante observado em pacientes com HAA, é que a incidência da doença é 10 vezes maior em indivíduos

acima dos 70 anos (2,5), e que embora a doença esteja associada a causas secundárias como autoimunidade e câncer, ainda existe muito a ser compreendido com relação a quais possíveis fatores podem estar associados com as manifestações idiopáticas, que abrangem mais de 50% de toda a etiologia descrita até o momento (13,17,85).

Alguns estudos discutem que a quebra da tolerância imunológica é um fator que pode estar relacionado com processo de envelhecimento, o que pode ser uma justificativa dos mecanismos de produção de autoanticorpos em idosos em diferentes doenças, inclusive na HAA (66,76,86).

Além disso, na última década foi identificado uma subpopulação de linfócitos B que possui como característica marcante a habilidade de expandir conforme o aumento da idade. Esse subtipo linfocitário, conhecido como células ABC (do inglês, *age-associated B cells*) tem sido considerado como um potencial modulador de diferentes doenças autoimunes (87). Sua imunofenotipagem é composta caracteristicamente por marcadores clássicos de linfócitos B, B220⁺ e CD19⁺, e marcadores mieloides como CD11c⁺ e CD11b⁺ (87,88), além de ser dependente do fator de transcrição T-bet (89). Esse subtipo celular é menos sensível ao BCR, e apresenta mais afinidade pelo receptor do tipo Toll (TLR) 7 e TLR9, induzindo a liberação de citocinas para diferenciação de células T por essa via de sinalização (90).

As células ABC são originadas nos centros germinativos (CG) dos linfonodos muito provavelmente após o estímulo de vários antígenos com o decorrer do tempo (91). A diferenciação celular ocorre por intermédio de sinais da imunidade inata e adaptativa, incluindo a ativação dos receptores TLR7 e TLR9 e o estímulo de citocinas como IFN- γ e IL-21, onde a IL-21 atua promovendo a regulação de *T-bet* e CD11c, e o IFN- γ induz a regulação do fator de transcrição *T-bet* (89,90).

Rubtsova e colaboradores (2013) ressaltaram a inter-relação entre a expressão de T-bet e o *clearance* viral e foram os primeiros autores a sugerir uma ligação entre as respostas antivirais e autoimunidade por intermédio do mesmo subtipo linfocitário, as células ABC. Isso devido a função desempenhada por essas células, via T-bet, que aumentam a produção de anticorpos e autoanticorpos do tipo IgG2 (92).

Embora esse subtipo celular não seja exclusivo em idosos, e na última década tenha sido identificado em diferentes doenças, incluindo LES, artrite idiopática juvenil, obesidade, Síndrome de Sjögren e artrite reumatoide (90), a literatura demonstra que durante a senescência, o *pool* de células B é dominado por células ABC de forma crescente. Além disso, trabalhos argumentam que esse aumento da prevalência das células ABC decorrente da idade pode contribuir para várias características bem estabelecidas da imunossenescência, incluindo gênese reduzida de linfócitos B e respostas imunes reduzidas (66,93).

Os tratamentos utilizados para autoimunidade acompanham severos efeitos colaterais, que podem estar associados a depleção total de células importantes para a resposta imune do paciente. O rituximabe, por exemplo, possui como alvo células CD20 positivas, e elimina uma quantidade significativa de plasmócitos (94). Estudos sugerem que as células ABC possam ser utilizadas como alvo terapêutico dirigido, para tratar diversas patologias de caráter autoimune, mantendo células CD20 e outras populações, e evitando os efeitos colaterais comumente observados (66,87).

1.7. Inibidores adquiridos do FVIII da coagulação

O FVIII é um cofator da coagulação que quando ativado, forma o complexo tenase com o FIX, atuando como cofator para o FIX durante a ativação proteolítica do FX. O complexo tenase possui papel essencial na superfície plaquetária, durante a fase de propagação, e o FXa na presença de FVa é capaz de converter a protrombina (FII) em trombina (FIIa) levando a formação de fibrina e a formação do coágulo.

O FVIII é uma proteína grande, com aproximadamente 300 kDa, composta por uma cadeia pesada (A1, A2 e B) e uma cadeia leve (A3, C1 e C2). Sua estrutura é capaz de interagir com diferentes moléculas, incluindo os fatores de coagulação IXa, X e Xa, fosfolípidos de membrana, proteína C ativada, trombinam e plasmina, conforme ilustrado na Figura 5 (95,96). Os domínios A e C são funcionais, e importantes para a função do FVIII, enquanto o domínio B não é essencial (97).

O FVIII é sintetizado pelo fígado, e circula em forma de complexo, associado ao fator de von Willebrand (FVW). Esse complexo possui um papel essencial na hemostasia, pois o FVW é responsável por proteger o FVIII da degradação proteolítica, aumentar a meia-vida do FVIII na circulação e promover a entrega do fator até o local da injúria (77,98).

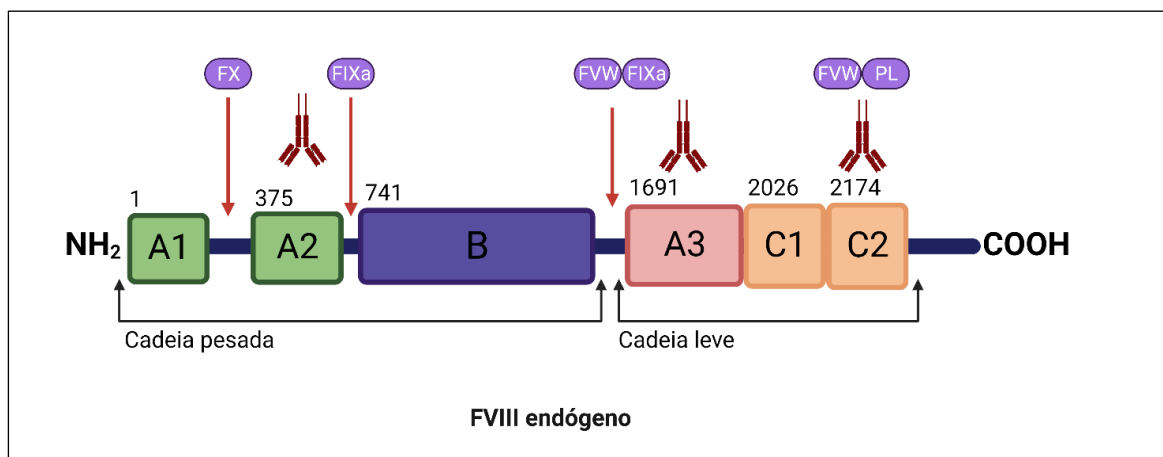


Figura 5. Estrutura da molécula do FVIII. O FVIII plasmático é um heterodímero composto de uma cadeia pesada (A1, A2 e B) e uma cadeia leve (A3, C1 e C2). A figura aponta os principais pontos de imunogenicidade observados na produção de autoanticorpos e aloanticorpos. Os autoanticorpos se ligam aos domínios C2 > A2 > A3. Os locais de interação com fatores de coagulação X e IXa também estão ilustrados, bem como os sítios de interação com o FVW (Fator de von Willebrand) e com fosfolípidos (6,97,99).

O ensaio de Bethesda identifica apenas inibidores que fazem impedimento estérico como mecanismo de neutralização. Estudos especulam que anticorpos que se ligam em domínios não funcionais que não são relevantes para a atividade do FVIII (como os domínios B, A1 e C1, por exemplo) podem induzir uma redução na estabilidade da molécula do FVIII, ou estarem envolvidos na formação de imunocomplexos, apresentando uma pequena importância clínica. Dessa forma, esses anticorpos são capazes de neutralizar totalmente ou parcialmente a ativação ou a função do fator de coagulação, e podem impactar em maior velocidade do *clearance* plasmático do FVIII (6,100,101).

Os inibidores são caracterizados pelo seu comportamento cinético em inibidores do tipo I ou inibidores do tipo II. Inibidores do tipo I ocorrem com maior frequência no desenvolvimento de aloanticorpos e se caracterizam por uma cinética de inativação linear que resulta na inibição completa da atividade do FVIII em altas

concentrações plasmáticas. Os inibidores do tipo II são mais comuns no desenvolvimento de autoanticorpos, e são caracterizados por serem incapazes de inativar o FVIII:C completamente, mesmo em concentrações máximas de anticorpo, resultando em uma grandeza não linear de atividade residual do FVIII x concentração de inibidor (6). Portanto, esse aspecto deve ser levado em consideração ao realizar o ensaio de Bethesda para confirmar a presença de inibidor.

Dentre os fatores que são estudados como responsáveis pela manifestação da autoimunidade e produção de autoanticorpos na HAA, está a presença de um contexto inflamatório, e algumas características genéticas. Um estudo demonstrou que pacientes com alelos DRB*16 e DQB1*0502 no HLA-II, e CTLA-4 + 49 G apresentam prevalência maior em pacientes com autoanticorpos (6,99).

A maior compreensão sobre a resposta imunológica do FVIII está associada predominantemente em estudos com HA. Tais estudos descrevem que a resposta imune contra o FVIII se inicia após a internalização da proteína por uma célula APC. A interação do MHC-II contendo peptídeos FVIII-específicos com o TCR cognato induz a expansão de linfócitos T que secretam citocinas capazes de aumentar a afinidade e maturação do linfócito B, além de permitir a troca de classe de imunoglobulinas e diferenciação do linfócito B em um plasmócito secretor de anticorpos específicos para o FVIII (102). Portanto, o que se sabe é que a produção de anticorpos específicos pelas células B ocorre primordialmente de forma dependente das células Th (79,95).

As células do sistema imunológico trabalham de forma coordenada e sinérgica e a atividade dos linfócitos B é altamente dependente da ativação e secreção de citocinas pelos linfócitos T efetores (*T helper*), incluindo as células Th1, Th2 e células Tfh (103). A interação entre células T e B não apenas iniciam a diferenciação e expansão de linfócitos B, como também ativam a troca de classe de imunoglobulinas, alterando a afinidade e maturação dos anticorpos (17). Dados sugerem que a produção de anticorpos IgG1 pode ocorrer pelo estímulo das células Th1, enquanto a produção dos anticorpos IgG4 é estimulada predominantemente pelas células Th2, mas também pode ser estimulada por células Tfh (8,21).

Na HAA, os autoanticorpos com propriedades neutralizantes, capazes de hidrolisar o FVIII são predominantemente da classe IgG (o que é semelhante com

a HA), e as subclasses são principalmente IgG4 (média de 95%) e IgG1 (média de 90%) (9,17,101,104).

Nem todas as respostas imunológicas são patogênicas, e estudos demonstram que mais de 15% de indivíduos saudáveis podem apresentar a produção de anticorpos não inibitórios sem nenhuma repercussão clínica (62). A produção e erradicação desses anticorpos faz parte de mecanismos de manutenção da homeostase imunológica. Nessas situações, os autoanticorpos anti-FVIII são neutralizados por anticorpos capazes de reagir com a região variável de outros anticorpos (anticorpos idiopáticos), controlando seu potencial inibidor. Embora a função biológica desses anticorpos não tenha sido elucidada, estudos comparativos demonstram que os isotipos e subclasse das Igs é diferente da população saudável e com HA, e nenhum indivíduo saudável produz IgG4, a principal Ig presente na HAA e na HA (17).

2. OBJETIVOS

Avaliar os mecanismos imunológicos envolvidos na HAA, com foco na resposta imune celular no desenvolvimento de inibidor ao FVIII e em relação à resposta imunossupressora, em uma coorte seguida longitudinalmente.

2.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar a resposta imune celular como elementos fisiopatológicos para a HAA.
- b) Avaliar a participação de células T efectoras (Th) (CD4⁺) e células T reguladora (Treg) (CD4⁺, CD25⁺ FoxP3⁺) na fisiopatologia da HAA, a partir da cultura de células isoladas do sangue periférico de pacientes.
- c) Avaliar a participação de células B (CD19⁺) e B10 (CD19⁺ CD24⁺ CD38⁺) na fisiopatologia da HAA, incluindo a expressão da BAFF (*B cell activating factor*) e APRIL (*a proliferation inducing ligand*).

- d) Avaliar a correlação entre as classes e subclasses de Igs e perfil das citocinas encontradas nos pacientes com HAA, de acordo com seu desfecho ao tratamento imunossupressor.
- e) Avaliar se o padrão de resposta imune celular é fator prognóstico para o desenvolvimento da HAA.

3. CASUÍSTICA

3.1 Desenho do estudo e seleção dos pacientes

Esse é um estudo prospectivo longitudinal, que incluiu pacientes com HAA, independentemente da idade e sexo, que foram diagnosticados e tratados no Hemocentro Unicamp durante os anos de 2014 até 2022.

Todos os pacientes consentiram em participar das avaliações de acordo como descrito e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (CAAE 56612316.3.0000.5404). Além disso, antes de serem incluídos no estudo, assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os pacientes diagnosticados com HAA são acompanhados por tempo indeterminado, e sua frequência de retorno ao serviço de hemoterapia depende da evolução clínica e gravidade dos sintomas (retornando inclusive após remissão completa para acompanhamento). O momento do diagnóstico, denominado de *baseline*, antecede o início de qualquer intervenção farmacológica e é importante para compreender melhor os fatores associados com a fisiopatologia da doença. As amostras para avaliações laboratoriais foram coletadas em diferentes tempos, sendo o *baseline* considerado como início para as avaliações.

3.2 Definições dos desfechos

Para definição dos desfechos dos nossos pacientes, utilizamos os critérios definidos na tabela 2, semelhantes aos critérios publicados (104).

Tabela 2. Definições para diagnóstico de hemofilia A adquirida e seus desfechos

Diagnóstico
• Título de inibidor > 0,6 UB/mL e atividade do FVIII < 50 UI/dL
Remissão Parcial (RP)
• Título de inibidor < 0,6 UB/mL e atividade do FVIII < 50 UI/dL, ou • Título de inibidor > 0,6 UB/mL e atividade do FVIII > 50 UI/dL, ou • Necessidade de imunossupressor para manutenção dos parâmetros da resposta completa
Remissão completa (RC)
• Título de inibidor < 0,6 UB/mL e atividade do FVIII > 50 UI/dL, após suspensão de tratamento imunossupressor.
Falha da resposta
• Não ter atingido os critérios de resposta após 12 meses de tratamento imunossupressor
Recaída
• Apresentar inibidor > 0,6 UB/mL e atividade do FVIII < 50 UI/dL após ter atingido remissão completa.

4. METODOLOGIA

4.1 Coleta e preparo das células mononucleares de sangue periférico (PBMC)

As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram separadas por gradiente de concentração, utilizando o reagente *Ficoll-Histopaque*[®], a partir da coleta de 40 mL de sangue periférico em tubos de heparina (como também eram coletados tubos para avaliação da atividade do FVIII e quantificação de inibidor anti-FVIII, até 60 mL poderiam ser coletados, de acordo com o quadro clínico do paciente).

O sangue periférico foi coletado de todos os pacientes com HAA em diferentes momentos do acompanhamento clínico: quando os pacientes foram diagnosticados, prévio ao início da imunossupressão (*baseline*), durante o acompanhamento, quando os pacientes estavam realizando o tratamento

imunossupressor, quando o paciente atingiu remissão completa e na ocorrência de recidiva.

As PBMCs foram separadas com em média 5×10^6 células por alíquota, que foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido até a realização das culturas.

4.2 Cultura de linfócitos e citometria de fluxo

As PBMCs foram descongeladas e cultivadas em uma placa de 48 poços, em meio RPMI-1640 suplementado com soro fetal bovino (10%), numa concentração de $7,5 \times 10^5$ células/poço. Após 24h do plaqueamento, as células foram estimuladas em três diferentes grupos, incluindo o grupo de células sem estímulo, estímulo de 1 IU/poço do concentrado de rFVIII (Advate[®], Takeda), e o grupo com acetato de miristato de forbol (PMA) (1 μ M) com ionomicina (1 μ M). Após 18h de estímulo, utilizamos brefeldina para interromper o trânsito intracelular de citocinas, e melhorar a qualidade da nossa avaliação. Ao completar 24h, as células foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur[™].

Para determinar o perfil de produção de citocinas das células T CD4⁺, marcamos as células T com anti-CD4, CD25, anti-interleucinas (IL)-4 (produzida por células Th2 e Tfh), IL-17a (produzida por células Th17), IL-21 (principal citocina produzida por Tfh), TGF- β (Fator de crescimento transformador β), IFN- γ (interferon gama) e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) (produzidas por células Th1). A presença das células TCD4⁺ CD25⁺ e FoxP3⁺ representa as células Tregs.

Além disso, para determinar a expressão de citocinas que podem estar envolvidas nas respostas autoimunes das células B, marcamos as células com anti-CD19, CD24, CD38, IL-10, BAFF, APRIL e SHIP-1 (inositol-fosfatase contendo domínio SH2).

4.3 Dosagem de BAFF e APRIL

Para determinar os níveis circulantes de BAFF e APRIL a partir do plasma de pacientes com HAA, seguindo os mesmos critérios para a coleta das amostras

para a realização da quantificação de inibidor, foi utilizado os kits comerciais da Abcam (Human APRIL ELISA Kit, ab119505, e Human BAFF ELISA Kit (TNFSF13B), ab188391) pela técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immunoassay*), conforme determinado pelo fabricante.

Os plasmas foram coletados em tubo citrato para quantificação de FVIII e inibidor. Após coleta, o plasma foi separado em centrifugação de 250 g por 10 minutos. As amostras foram utilizadas para quantificação do inibidor, TTPa e algumas alíquotas foram congeladas a -80°C, até os ensaios serem realizados.

4.4 Análises estatísticas

Foram realizadas análises descritivas das variáveis nominais, utilizando frequências absolutas e relativas e mediana e valores mínimos e máximos ou intervalo interquartil (IQR) para variáveis contínuas assimétricas.

A comparação entre os grupos foi realizada por meio do teste *t* de *student* e Mann-Whitney para variáveis numéricas e teste exato de Fisher para variáveis categóricas. A correlação entre as variáveis numéricas com distribuição não normal foi avaliada com o coeficiente de correlação de *Spearman* (105). O nível de significância adotado para o estudo foi de 5%. Todas as análises foram realizadas pelo GraphPad Prism 8.4 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5. RESULTADOS

5.1. Aspectos clínicos e epidemiológicos

Esse estudo incluiu 23 pacientes que foram diagnosticados com HAA no Hemocentro Unicamp entre dos anos de 2014 até dezembro de 2022. As informações demográficas podem ser observadas na tabela 3.

Em nossa coorte, 73,9% (N=17) alcançaram remissão completa, sendo que 14 pacientes alcançaram remissão completa sustentada e 3 pacientes recidivaram pelo menos uma vez após atingirem remissão. Além disso, 8,7% (N=2) dos

pacientes foram considerados como falha ao regime de imunossupressão de primeira linha, pois não apresentaram resposta ao tratamento até 12 meses depois de terem iniciado o uso da medicação. Quatro pacientes (17,4%) foram censurados do estudo longitudinal, devido dados insuficientes para as análises subsequentes ao diagnóstico.

Tabela 3. Características demográficas e clínicas ao diagnóstico

Característica	Coorte (n=23)
Idade (anos), mediana (mín. – máx.)	61 (3-79)
Sexo, n (%)	
Feminino	15 (65,2)
Masculino	8 (34,8)
Mediana de tempo, em dias (IQR)	
Primeiro sintoma até o diagnóstico	49 (26-110)
Tempo até atingir remissão parcial	140 (82-279)
Remissão até a recaída	846 (61-923)
Tempo de seguimento	241 (193,7-365,5)
Doença de base, n (%)	
Idiopático	10 (43,4)
Autoimunidade*	6 (26,1)
Infecção viral	3 (13,1)
Malignidade	3 (13,1)
Gravidez	1 (4,3)
Atividade do FVIII, UI/dL – mediana (mín. – máx.)	0,2 (0 – 18,8)
Título de inibidor, UB/mL – mediana (mín. – máx.)	117,6 (1,46 – 4138,5)

* Uma paciente diagnosticada com imunodeficiência combinada grave (SCID) manifestou autoimunidade. IQR, intervalo interquartil; UI/dL, unidades internacionais por decilitro; UB/mL, unidades de Bethesda por mililitro.

A mediana de tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico foi de 49 dias (IQR 26 e 110 dias) e a mediana para iniciar o tratamento após o diagnóstico foi de 4 dias (IQR 1 e 13 dias). Ao diagnóstico, a mediana do título inibidor foi de 117,6 UB/mL (mín.1,46 e máx. 4138,5 UB/mL) e a mediana da atividade do FVIII foi de 0,2 UI/dL (mín. 0 e máx. 18,8 UI/dL).

A terapia imunossupressora de primeira escolha baseou-se na associação de prednisona (1mg/kg) e ciclofosfamida (até 100mg/dia), e foi prescrita para 18 pacientes (78%). Três pacientes (13%) fizeram monoterapia com prednisona e um (4,5%) utilizou apenas ciclofosfamida. Aqueles que não responderam ao tratamento

de primeira linha, foram submetidos para segunda linha de tratamento, que consistiu predominantemente ao uso de rituximabe (Tabela 4). Três pacientes tratados com terapia combinada de prednisona e ciclofosfamida e um paciente tratado apenas com prednisona evoluíram com recaída.

Tabela 4. Terapia imunossupressora utilizada

Tratamento de primeira linha	N = 22 (%)
Prednisona com ciclofosfamida	18 (78)
Prednisona	3 (13)
Ciclofosfamida	1 (4,5)
Sem tratamento*	1 (4,5)
Tratamento de resgate (segunda linha)	
Rituximabe**	3 (13)
Vincristina + ciclofosfamida + prednisona***	1 (4)
Prednisona	1 (4)
Prednisona com ciclofosfamida	1 (4)

*O paciente 4 não entrou no regime de IS para HAA devido quadro de endocardite durante internação hospitalar, contudo recebeu bortezumibe (com/regime). **Regime com rituximabe: os pacientes 9 e 18 utilizaram 4 doses semanais de 500mg, e a paciente 17 utilizou 1g/dia a cada 15 dias. ***Terapia combinada de VCP cada 21 dias – total de 6 ciclos (ciclofosfamida: 750mg/m² intravenoso [IV] / dia [D], vincristina:1,4mg/m² IV D1 [máxima 2mg]; prednisona: 40mg/m² VO D1-D5).

Na tabela 5 é possível observar os principais efeitos colaterais reportados, que se associam principalmente ao uso de corticosteroides, incluindo diabetes *mellitus*/aumento da glicemia (17% dos pacientes), síndrome de *Cushing* (4,5%), elevação da pressão arterial (4,5%). Associado ao uso de ciclofosfamida foi observado neutropenia e/ou linfopenia (9%) e anemia (4,5%). A imunossupressão acarretou infecções em três pacientes, incluindo candidíase oral, pneumonia, infecção no trato urinário e herpes zoster.

Tabela 5. Principais efeitos colaterais reportados associados à imunossupressão

Efeitos colaterais após imunossupressão	23 (%)
Descompensação do diabetes <i>mellitus</i> / aumento da glicemia	4 (17)
Síndrome de <i>Cushing</i> associada a corticoide	1 (4,5)
Infecções	3 (13)
Neutropenia ou linfopenia*	2 (9,0)
Aumento de pressão arterial	1 (4,5)
Anemia pela ciclofosfamida	1 (4,5)
Astenia	1 (4,5)

* Neutrófilos ou linfócitos $\leq 1.500/\text{mm}^3$

Uma paciente do sexo feminino de 64 anos, (paciente 18) com HAA de etiologia idiopática, foi submetida ao tratamento imunossupressor com prednisona associado à ciclofosfamida por mais de 12 meses. Os níveis de inibidores da paciente ao diagnóstico eram de 273,28 UB/mL. Valores positivos de inibidor e atividade de FVIII < 50% foram mantidos durante treze meses. Cinco meses após remissão parcial a paciente recaiu permanecendo com título de inibidor positivo por 30 meses. Após esse período, foi submetida a seis ciclos de terapia combinada com vincristina, ciclofosfamida e prednisona (CVP), apresentando erradicação do inibidor e restauração dos níveis de FVIII circulante após o sexto ciclo, permanecendo em remissão até a presente data.

Outro paciente do sexo masculino, 56 anos (paciente 23) foi diagnosticado com HAA, desenvolvida secundariamente após mieloma múltiplo. O paciente não apresentou sangramentos espontâneos, mas recebeu transfusão de hemocomponentes devido concentrações de hemoglobina iguais a 6,6 g/dL. Ao ser admitido no Hemocentro o paciente apresentava concentração de inibidor igual a 2,25 UB/mL e FVIII:C de 9,8UI/dL, e não fez imunossupressão para tratar a HAA pois apresentava endocardite bacteriana. Ao se recuperar da infecção, o paciente foi tratado para o mieloma com bortezomibe, o que contribuiu para erradicação do inibidor. Até o momento em que os dados estão sendo divulgados nessa tese, o paciente segue com remissão completa sustentada.

As principais características laboratoriais observadas ao diagnóstico estão disponibilizadas na tabela 6. Como um dos objetivos do estudo buscava identificar

fatores preditores da resposta ao tratamento, os pacientes foram agrupados de acordo com o desfecho, e as informações detalhadas estão disponíveis, incluindo os valores dos níveis de FVIII:C e inibidor, concentração de hemoglobina, contagem de plaquetas e a dosagem de TTPa.

Tabela 6. Características clínicas ao diagnóstico e esquema terapêutico

ID	Idade	Sexo	Etiologia	TI 1ª linha	TI 2ª linha	Seguimento (dias*)	Diagnóstico (dias*)	Inibidor (UB/mL)	FVIII:C (UI/dL)	Hb (g/dL)	Plt (mm ³)	TTPa
Remissão completa sustentada												
1	45	F	Idiopático	Pred+CTX	-	2065	30	1,46	2,7	11,3	311	-
2	52	M	Idiopático	Pred+CTX	-	1866	90	60,02	4	13,2	267	49,6
3	75	F	Idiopático	Pred+CTX	-	2090	60	117,61	0	9,2	303	103,6
9	61	F	Idiopático	Pred+CTX	-	1303	127	1006,25	0,7	9,8	391	95,2
10	54	M	Autoimune	Pred+CTX	-	2048	5	4,56	0,4	15,4	273	68,6
12	62	M	Idiopático	Pred+CTX	-	1703	180	18,8	27,7	14,5	257	41,1
13	61	F	Neoplasia	Pred+CTX	-	904	20	158,29	1,7	8,8	222	115
17	59	F	Idiopático	CTX	-	2650	45	7,68	11,2	14,4	316	38,4
19	40	F	Gestação	Pred+CTX	-	2018	180	136,61	0	12,1	233	106,4
20	67	F	Viral	Pred+CTX	-	340	512	158,78	8,7	14,8	205	86,7
21	61	M	Neoplasia**	Pred+CTX	-	301	7	106,58	0	7,5	108	126,4
22	75	F	Autoimune	Pred+CTX	-	189	299	62,61	0,2	10,6	269	97,7
23	56	M	Neoplasia	Sem TI***	-	90	1	2,25	9,8	6,6	145	57,7
Recaída												
7	63	F	Idiopático	Pred+CTX	Pred+CTX	1095	64	146,53	0,1	7,8	257	157,3
8	49	M	Autoimune	Pred+CTX	RTX	2712	30	26,18	0	9,8	529	132,1
11	64	M	Viral	Pred	Pred	2935	30	128,98	12,07	16,3	245	48,6
15	57	F	Autoimune	Pred+CTX	RTX	800	20	28,17	0	9,2	292	86,7
Falha												
16	9	F	Idiopático	Pred	RTX	2494	90	20,57	0	13,4	248	97,7
18	64	F	Idiopático	Pred+CTX	VCP	2927	390	273,28	5,73	12,6	287	52,5

Censura												
4	75	F	Neoplasia	Pred+CTX	ND	56	30	215,41	0,2	ND	ND	96,4
5	79	F	Idiopático	Pred+CTX	ND	305	30	1842,83	0	11	334	107,1
6	36	M	Viral	Pred+CTX	ND	317	90	4138,47	0	10,9	372	119,4
14	3	F	Autoimune	Pred	ND	305	4	202,58	0,1	8,2	121	106,5

*Tempo de seguimento desde o diagnóstico até julho de 2022, ou censura/óbito; **Paciente portador de mieloma múltiplo com desenvolvimento de HAA secundária após transplante de medula óssea; ***Paciente portador de mieloma múltiplo sem imunossupressão direta para HAA devido quadro clínico (recebeu tratamento para a doença de base, que resultou na erradicação sustentada do inibidor). ID, identificação do paciente; FVIII:C, atividade do FVIII; Ig, imunoglobulina; F, feminino; M, masculino; Hb, hemoglobina; TI, tratamento imunossupressor; Plt, plaquetas; TTPa, tempo de protrombina parcial ativado; Pred, prednisona; CTX, ciclofosfamida; RTX, rituximabe; VCP, vincristina + ciclofosfamida + prednisona; ND, não determinado.

5.1.1. Acompanhamento longitudinal de um paciente com várias recaídas durante o tratamento (paciente 8)

Um paciente com HAA secundária a autoimunidade (glomerulonefrite membranosa) foi tratado com terapia combinada de primeira linha (prednisona e ciclofosfamida), apresentando duas recaídas depois de atingir remissão. Os níveis de FVIII:C e o título do inibidor foram avaliados em todo o seguimento clínico. A frequência de citocinas foi analisada em momentos específicos (mediante a disponibilidade de PBMC) (Figura 6). A persistência do inibidor após o protocolo de primeira linha, e as duas recaídas subsequentes foram manejadas com rituximabe, onde o paciente atingiu remissão sustentada por longos períodos antes de recair.

A análise individual da produção de citocinas em células CD4⁺ sob estímulo do rFVIII, demonstra uma flutuação de suas frequências que não parece estar associada com os títulos de inibidores anti-FVIII (Figura 7A). Analisando individualmente, a produção de BAFF e APRIL por células CD19⁺ (Figura 7B) após estímulo com rFVIII (1 UI/poço, durante 24h) também não apresentam alterações que variem conforme a produção de inibidor, e para facilitar a interpretação dessa análise, mais pontos precisariam ser incluídos durante o seguimento longitudinal.

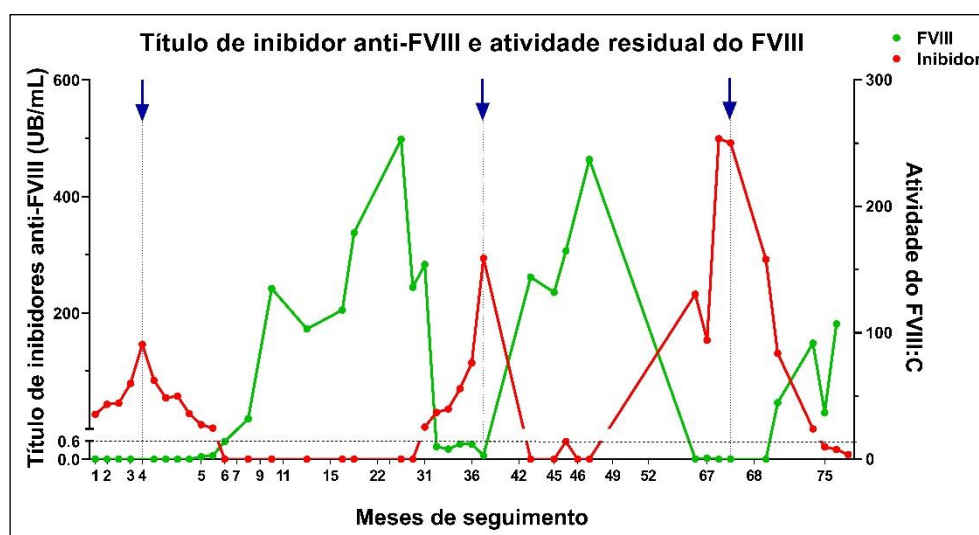


Figura 6. Acompanhamento longitudinal dos níveis de FVIII:C e atividade do inibidor anti-FVIII do paciente 8. O gráfico representa o acompanhamento longitudinal pelo período de 75 meses (2015-2022). Níveis de FVIII:C e título de inibidor anti-FVIII durante o seguimento. Título de inibidor $\leq 0,6$ UB/mL são considerados negativos. As setas azuis indicam o momento do seguimento em que foi realizado o tratamento com rituximabe.

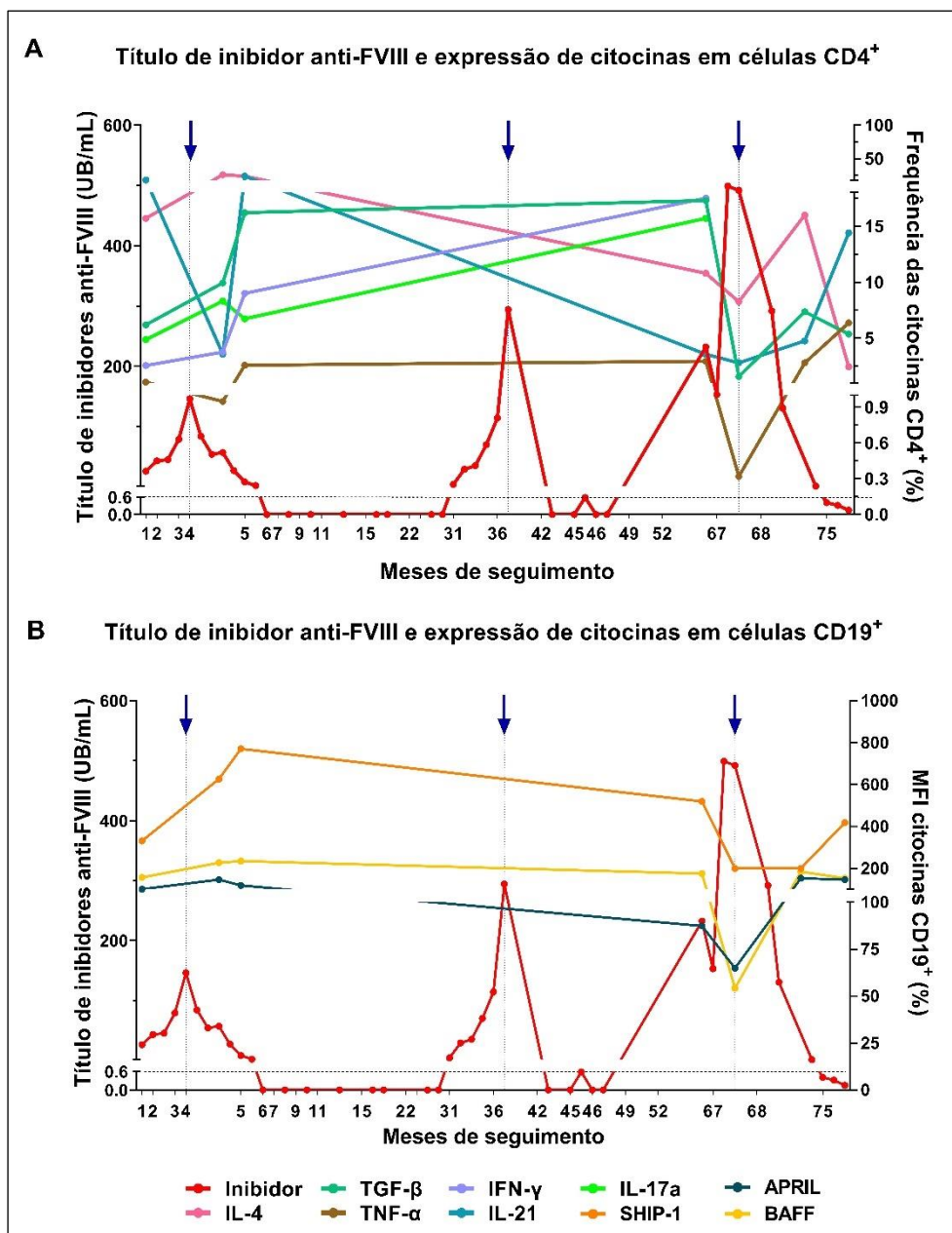


Figura 7. Acompanhamento longitudinal da produção de citocinas em células CD4⁺ e CD19⁺ do paciente 8. Os gráficos apresentam o acompanhamento longitudinal pelo período de 88 meses (2015-2022). As células foram estimuladas por 24 horas com 1UI de rFVIII antes das análises por citometria de fluxo. O gráfico **A** demonstra a frequência de citocinas produzidas por células CD4⁺ durante o acompanhamento. As análises de citometria foram realizadas preferencialmente ao baseline, na primeira e segunda recaída e durante a imunossupressão. O gráfico **B** mostra a média de intensidade de fluorescência (MFI) das citocinas produzidas por células CD19⁺. As setas azuis indicam o momento do seguimento em que foi realizado o tratamento com rituximabe.

5.1.2. Acompanhamento longitudinal de uma das pacientes que falharam ao tratamento (paciente 16)

A paciente 16 possuía 9 anos quando foi diagnosticada com quadro de HAA de origem idiopática. Os níveis de inibidores da paciente aumentaram consideravelmente, mesmo quando ela estava sob uso de monoterapia de corticosteroide (prednisona 1mg/kg), e não foi observado resposta após monoterapia de prednisona (6 meses de tratamento). Portanto, como terapia de segunda linha, a paciente utilizou rituximabe (500mg/semana, durante 4 semanas), permanecendo com níveis de inibidor positivo e níveis de FVIII inferiores a 50UI/dL por mais de 12 meses (portanto indicando falha na resposta).

Embora tenha sido observado uma demora na resposta ao tratamento, por se tratar de uma criança que não manifestou sintomas clínicos, com níveis de FVIII:C acima de 1% (Figura 8), e que demonstrava um declínio gradual dos títulos de inibidor, optou-se por manter a paciente sob observação frequente e sem intervenção farmacológica até a remissão.

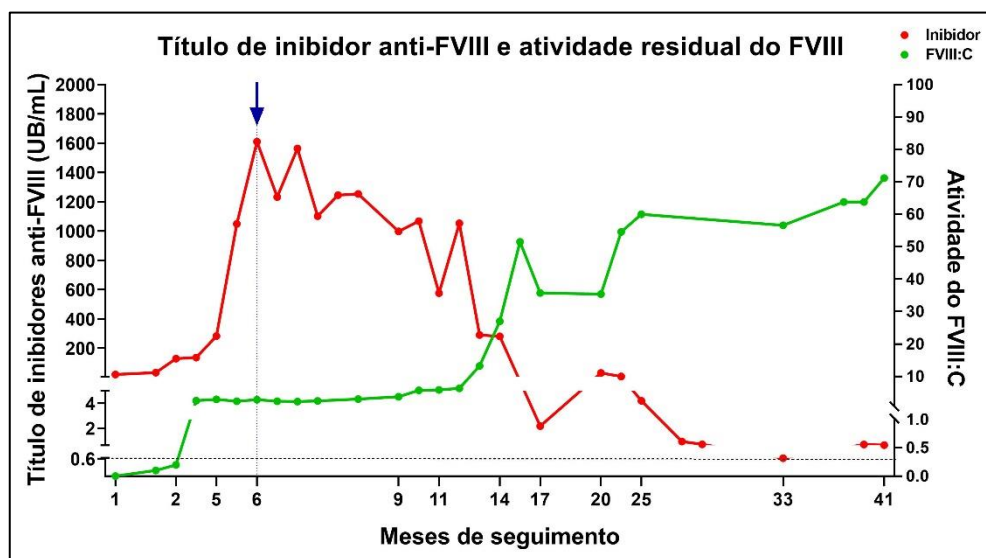


Figura 8. Acompanhamento longitudinal dos níveis de FVIII:C e atividade do inibidor anti-FVIII da paciente 16. O gráfico representa o acompanhamento longitudinal pelo período de 41 meses (2015-2019). Níveis de FVIII:C e título de inibidor anti-FVIII durante o seguimento. Título de inibidor < 0,6 UB/mL são considerados negativos. A seta azul indica o momento do seguimento em que foi realizado o tratamento com rituximabe.

Com relação à análise individual da produção de citocinas, é possível observar que as frequências das citocinas tanto para células CD4⁺ quanto CD19⁺

tendem a diminuir conforme a resposta ao tratamento (Figuras 9A e 9B). O IFN- γ é a única citocina que apresenta um pico de produção um pouco antes da paciente restaurar a função do FVIII (54,6% UI/dL).

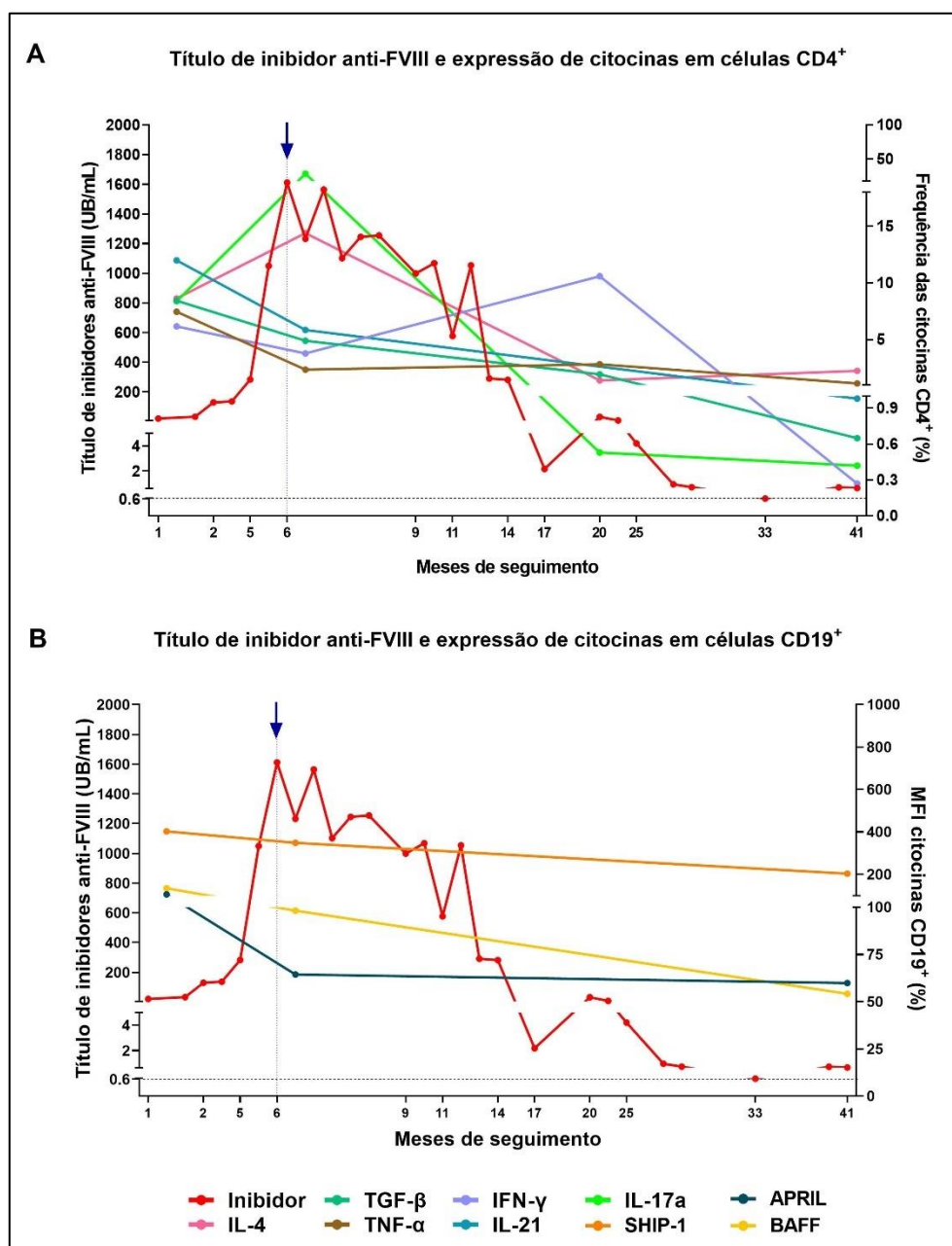


Figura 9. Acompanhamento longitudinal dos níveis de FVIII:C e atividade do inibidor anti-FVIII da paciente 16. Os gráficos apresentam o acompanhamento longitudinal pelo período de 41 meses (2015-2019). As células foram estimuladas por 24 horas com 1UI de rFVIII antes das análises por citometria de fluxo. O paciente não possui informações da produção de citocinas na remissão. O gráfico A demonstra a frequência de citocinas produzidas por células CD4⁺ durante o acompanhamento. As análises de citometria foram realizadas preferencialmente ao baseline, na primeira e segunda recaída e durante a imunossupressão. O gráfico B mostra a média de intensidade de fluorescência (MFI) das

citocinas produzidas por células CD19⁺. A seta azul indica o momento do seguimento em que foi realizado o tratamento com rituximabe.

5.2. Detalhamento do perfil de citocinas observado durante o estudo

5.2.1. Resposta das células efectoras Th17 e Treg

Para compreender melhor os possíveis mecanismos fisiopatológicos associados à resposta ao tratamento, os pacientes do estudo foram agrupados de acordo com a resposta à terapia imunossupressora. Portanto, além de serem analisados todos os pacientes durante o *baseline*, os pacientes foram divididos em dois grupos: pacientes que alcançaram uma remissão completa sustentada (RC sustentada) e pacientes que falharam ou recaíram ao tratamento.

A frequência de IL-17a é considerada uma assinatura da resposta imune mediada por células Th17. Observamos que a IL-17a encontra-se significativamente elevada em pacientes com HAA ao diagnóstico (*baseline*) independente da resposta ao tratamento imunossupressor. Foi possível observar que os níveis intracelulares de IL-17a em linfócitos T CD4⁺ cultivados com ou sem FVIII estavam elevados ao *baseline* tanto no grupo de pacientes com RC sustentada ($P = 0,01$), quanto com recaída ou falha ($P < 0,0001$) ao serem comparados com indivíduos saudáveis (figura 10). Além disso, não se observou diferença significativa na frequência de IL-17a das células submetidas a estímulo com rFVIII.

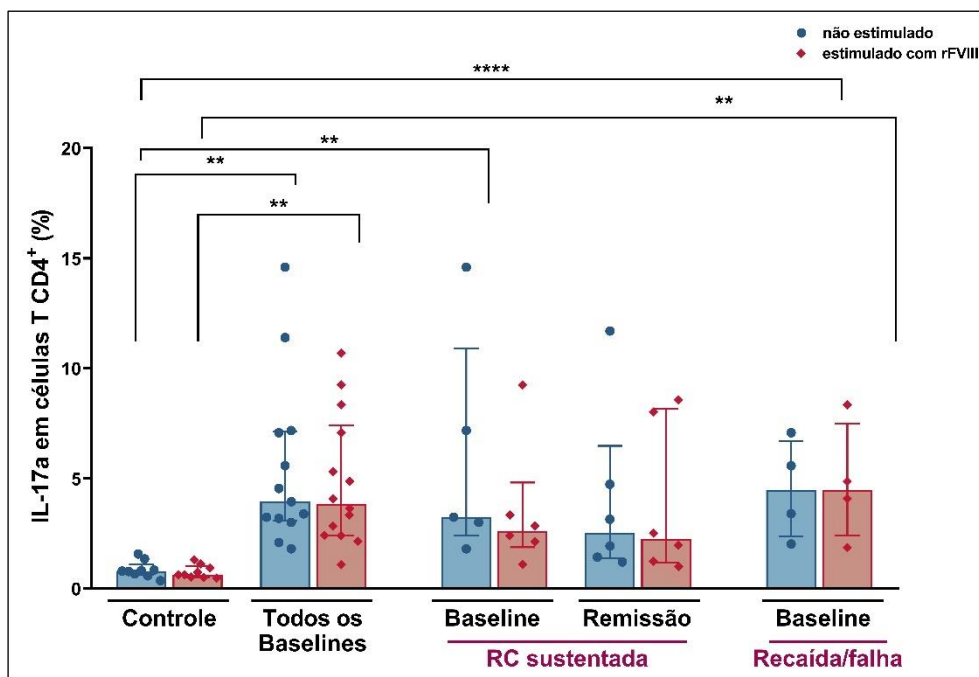


Figura 10. Expressão de IL-17a em pacientes com hemofilia A adquirida. Os círculos azuis expressam os grupos que não receberam nenhum estímulo durante a cultura, e os losangos vermelhos representam os grupos de células estimuladas com rFVIII por 24h. ** $P = 0,01$; **** $P < 0,0001$. Teste de Mann-Whitney.

Ao avaliar a produção de TGF- β em PBMCs (CD4⁺) de pacientes com HAA (figura 11), não foi possível observar diferenças entre a presença ou ausência de estímulo com rFVIII. Contudo, foi possível visualizar elevação nos níveis intracelulares dessa citocina ao *baseline* de todos os grupos analisados, tanto nos pacientes com RC sustentada ($P = 0,001$), quanto nos que recaíram ou falharam ao tratamento ($P < 0,0001$). No momento da remissão do grupo de RC sustentada, a expressão de TGF- β é reduzida significativamente quando comparada com o *baseline* ($P = 0,05$). Portanto, a frequência de TGF- β encontra-se significativamente elevada em pacientes com HAA ao diagnóstico (*baseline*), independente da resposta ao tratamento imunossupressor.

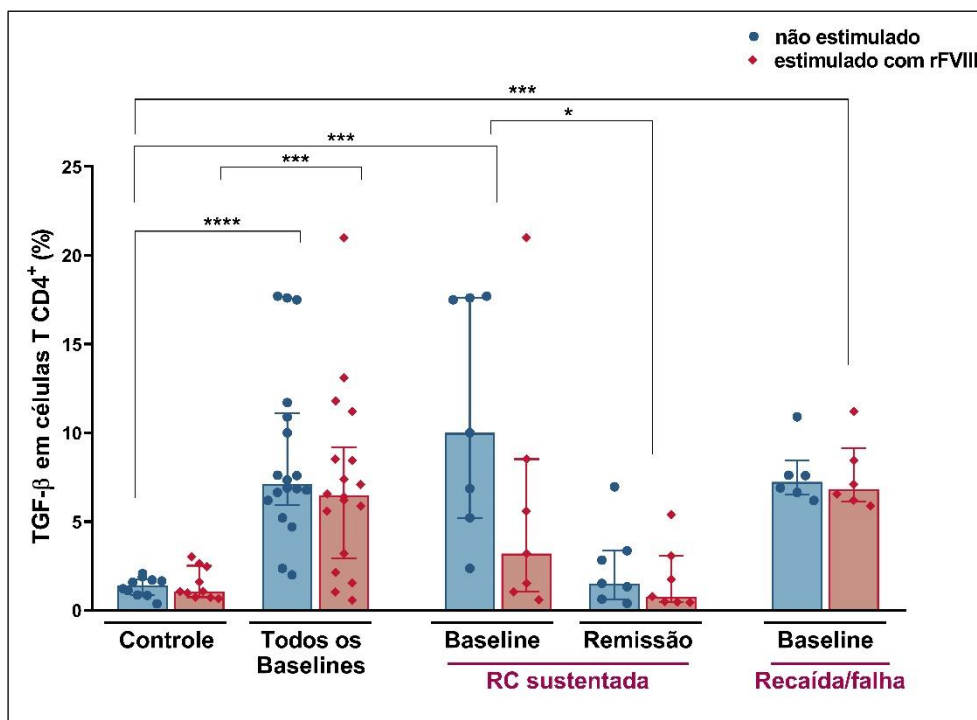


Figura 11. Expressão de TGF- β em pacientes com hemofilia A adquirida. Os círculos azuis expressam os grupos que não receberam nenhum estímulo durante a cultura, e os losangos vermelhos representam os grupos de células estimuladas com rFVIII por 24h. * P = 0,05; *** P = 0,001; **** P < 0,0001. Teste de *Mann-Whitney*.

A produção de células Tregs (linfócitos com fenótipo TCD4⁺ CD25⁺ e FoxP3⁺) não mostrou diferença significativa entre os grupos de pacientes e indivíduos saudáveis (figura 12). Em conjunto, esses dados sugerem que no contexto da HAA a citocina TGF- β atue predominantemente na diferenciação e produção de linfócitos Th17. Além disso, esses resultados apontam para uma atividade de linfócitos Th17 desde o princípio da manifestação da doença, sendo sugestivo para a participação dessa subpopulação de linfócitos logo no início do desenvolvimento da autoimunidade contra o FVIII.

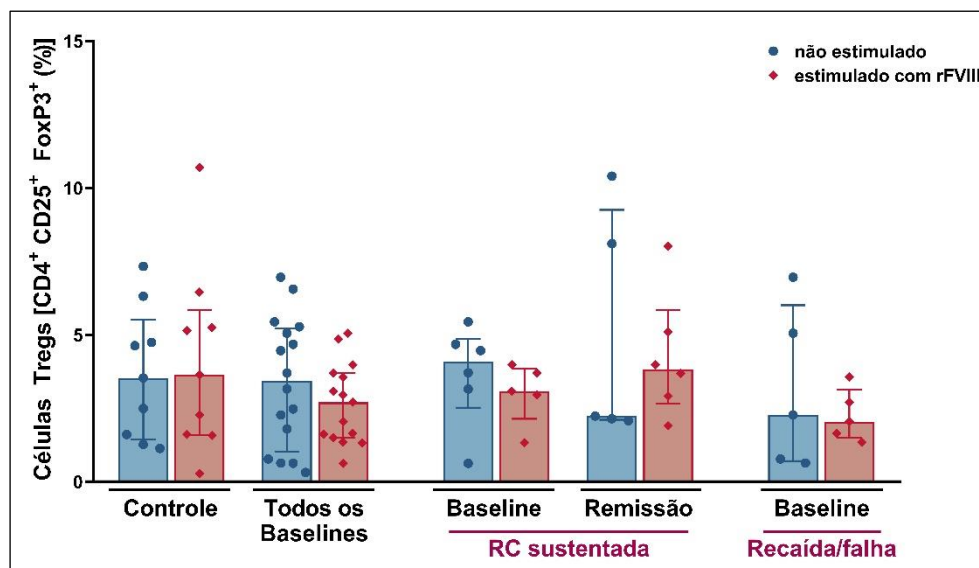


Figura 12. Expressão de Células T CD4+ CD25+ FoxP3+ (Tregs) em pacientes com hemofilia A adquirida. Os círculos azuis expressam os grupos que não receberam nenhum estímulo durante a cultura, e os losangos vermelhos representam os grupos de células estimuladas com rFVIII por 24h. * P = 0,05; *** P = 0,001; **** P < 0,0001. Teste de Mann-Whitney.

5.2.2. Resposta das células efectoras T foliculares (Tfh) e/ou Th2

A principal citocina relacionada com a produção de células Tfh é a IL-21. É muito importante enfatizar que a IL-21 também é produzida por células Th17, e como nosso desenho de estudo não nos possibilitou observar a expressão de fatores de transcrição nessas células, não foi possível distinguir com maior certeza qual é a fonte exata dessa citocina.

A frequência de células TCD4+IL-21+ foi analisada após cultura do PBMC, e os níveis da citocina se apresentaram elevados ao *baseline* de todos os grupos de pacientes, quando comparado com indivíduos saudáveis (Figura 13), incluindo aqueles que alcançaram remissão completa sustentada ($P=0,02$) e os pacientes que recaíram ou falharam ao tratamento ($P=0,01$). Mostrando que a produção de IL-21 é significativamente elevada em pacientes com HAA ao diagnóstico (*baseline*), independente da resposta ao tratamento imunossupressor.

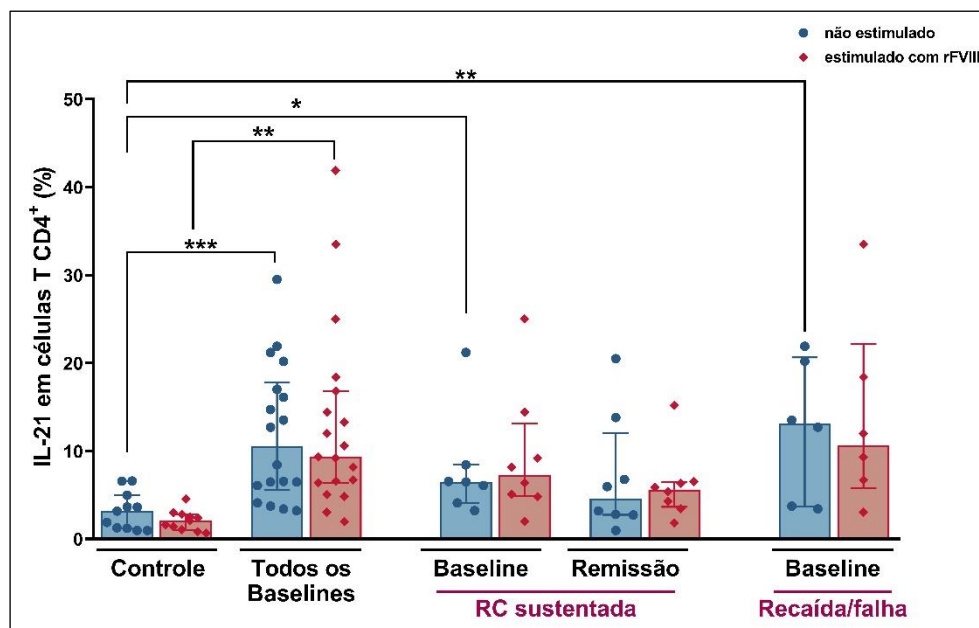


Figura 13. Expressão de IL-21 em pacientes com hemofilia A adquirida. Os círculos azuis expressam os grupos que não receberam nenhum estímulo durante a cultura, e os losangos vermelhos representam os grupos de células estimuladas com rFVIII por 24 horas. * $P = 0,05$; ** $P = 0,01$; *** $P = 0,001$. Teste de *Mann-Whitney*.

Além disso, outra citocina investigada foi a IL-4, que faz parte da assinatura das células Th2, mas também pode ser expressa em célula Tfh. Ao analisar o *baseline* geral, que inclui todos os pacientes com HAA, é possível detectar um aumento significativo da frequência de IL-4 ($P = 0,05$). Entretanto, quando os grupos de desfecho são avaliados individualmente, apenas os pacientes que recaíram ou falharam à terapia imunossupressora apresentam diferença quando comparado com culturas de indivíduos saudáveis ($P = 0,05$). Pacientes que alcançaram remissão completa sustentada não apresentam diferença na produção de IL-4, como pode ser observado na figura 14. Esses dados nos mostram que a frequência de IL-4 é maior apenas ao *baseline* dos pacientes que recaíram ou falharam ao tratamento imunossupressor.

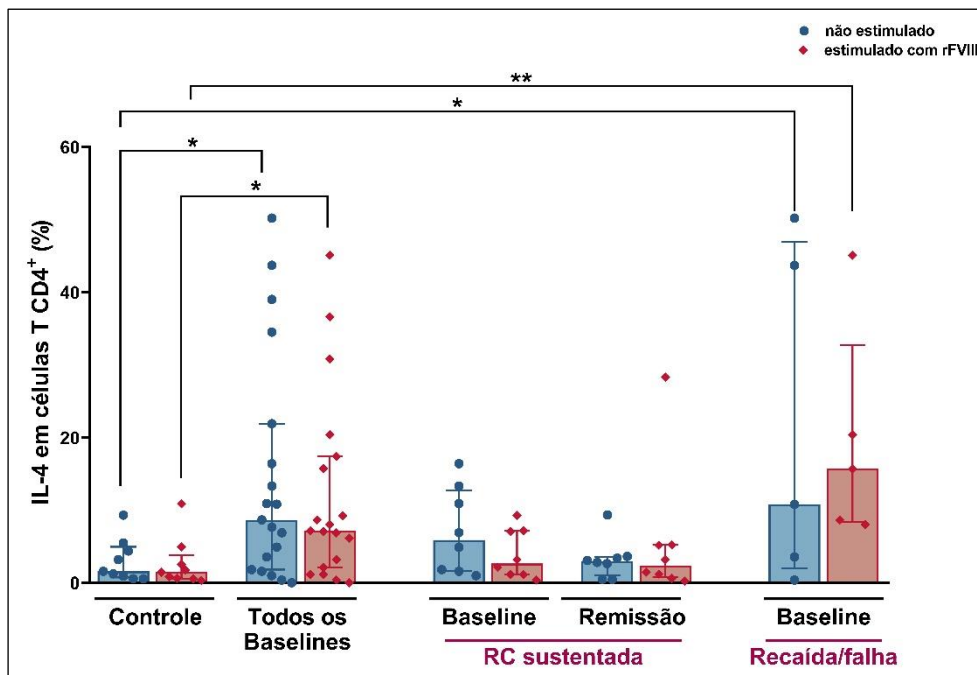


Figura 14. Expressão de IL-4 em pacientes com hemofilia A adquirida. Os círculos azuis expressam os grupos que não receberam nenhum estímulo durante a cultura, e os losangos vermelhos representam os grupos de células estimuladas com rFVIII por 24 horas. * $P = 0,05$; ** $P = 0,01$. Teste de *Mann-Whitney*.

5.2.3. Resposta das células efetoras Th1

As principais citocinas produzidas por células Th1 são o IFN- γ e o TNF- α . Nesse trabalho, os níveis intracelulares de IFN- γ apresentaram-se aumentados em células CD4⁺ apenas no grupo de pacientes que falhou ou recaiu ao tratamento imunossupressor (figura 15), em relação aos indivíduos controle ($P = 0,001$).

Curiosamente, bem como a produção de IFN- γ , os níveis de TNF- α foram observados aumentados apenas ao *baseline* das células o grupo que recaiu ou falhou ao uso de corticosteroides associados à ciclofosfamida ($P = 0,05$) (figura 16).

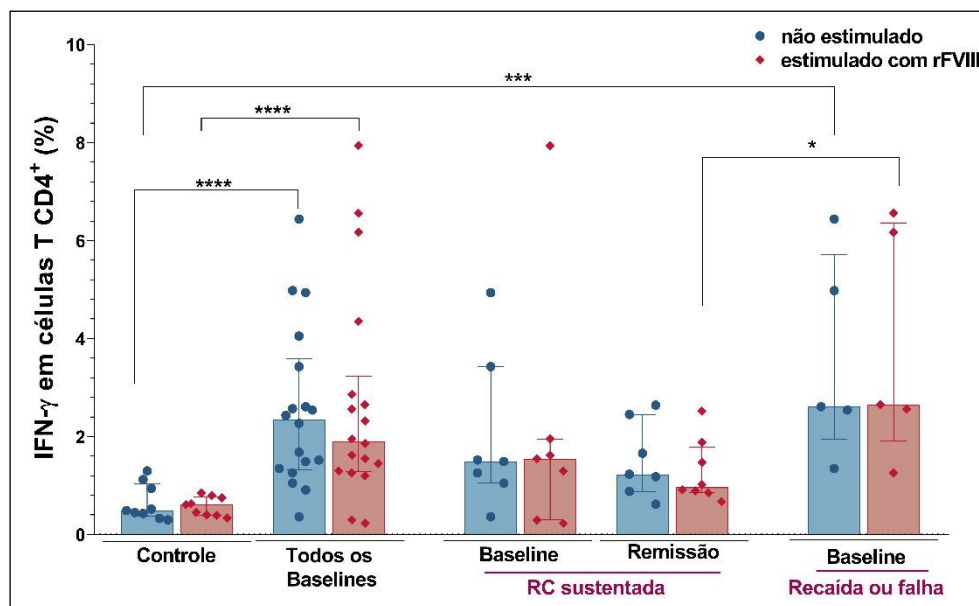


Figura 15. Expressão de IFN- γ em pacientes com hemofilia A adquirida. Os círculos azuis expressam os grupos que não receberam nenhum estímulo durante a cultura, e os losangos vermelhos representam os grupos de células estimuladas com rFVIII por 24 horas. * $P = 0,05$; *** $P = 0,001$; **** $P < 0,0001$. Teste de Mann-Whitney.

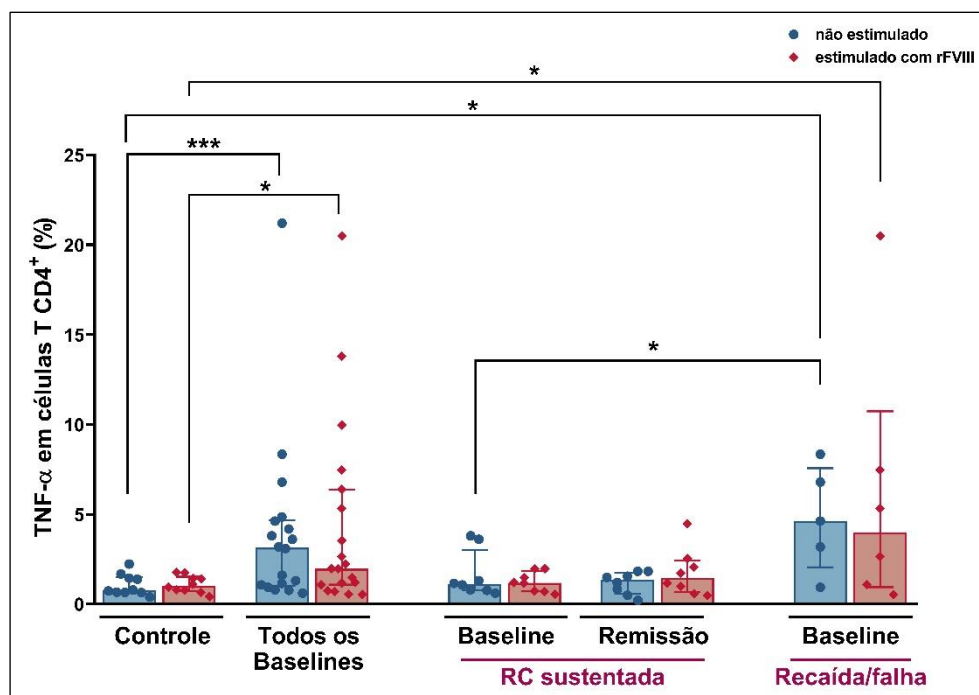


Figura 16. Expressão de TNF- α em pacientes com hemofilia A adquirida. Os círculos azuis expressam os grupos que não receberam nenhum estímulo durante a cultura, e os losangos vermelhos representam os grupos de células estimuladas com rFVIII por 24 horas. * $P = 0,05$; *** $P = 0,001$; **** $P < 0,0001$. Teste de Mann-Whitney.

Portanto, esses dados demonstram que a produção IFN- γ e TNF- α está elevada apenas em pacientes que recaíram ou falharam ao tratamento imunossupressor.

5.2.4. Resposta dos linfócitos B CD19⁺

Inicialmente, buscamos entender se existiria alguma diferença entre a produção de células B regulatórias entre os pacientes em comparação aos indivíduos saudáveis. Para isso, quantificamos a expressão da IL-10 em linfócitos B reguladores (subpopulação CD19⁺ CD24⁺ CD38⁺) e comparamos indivíduos saudáveis com pacientes com HAA, onde não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos avaliados.

Portanto, partimos para o pressuposto de que outro mecanismo de indução da autorreatividade de linfócitos B, relacionado com a quebra da tolerância imunológica poderia estar comprometido em nosso modelo de estudo e investigamos a frequência de duas citocinas da superfamília do TNF (TNFSF), a BAFF e a APRIL. Essas citocinas estão associadas à autorreatividade de células B em diferentes modelos de doenças autoimunes.

Foi observado um aumento na produção de BAFF em células B CD19⁺ de PBMC cultivado por 24h (Figura 17A) ao comparar com PBMC de indivíduos saudáveis ($P = 0,05$). As culturas de células dos pacientes que falharam ou recaíram pelo menos uma vez à terapia imunossupressora, apresentam ao diagnóstico (*baseline*), níveis de BAFF ainda maiores do que os pacientes que alcançaram RC sustentada ($P = 0,05$). Além disso, procuramos detectar os níveis séricos de BAFF no plasma de pacientes com HAA ao diagnóstico. Nesse caso, as concentrações de BAFF também se mostraram estatisticamente maiores que os controles saudáveis ($P = 0,004$) (Figura 17B).

Procurando por outras proteínas que poderiam estar envolvidas com a autorreatividade do BCR, quantificamos a expressão da fosfatase SHIP-1. Não foi possível observar alterações significativas nos níveis de SHIP-1 entre os grupos de pacientes e indivíduos saudáveis.

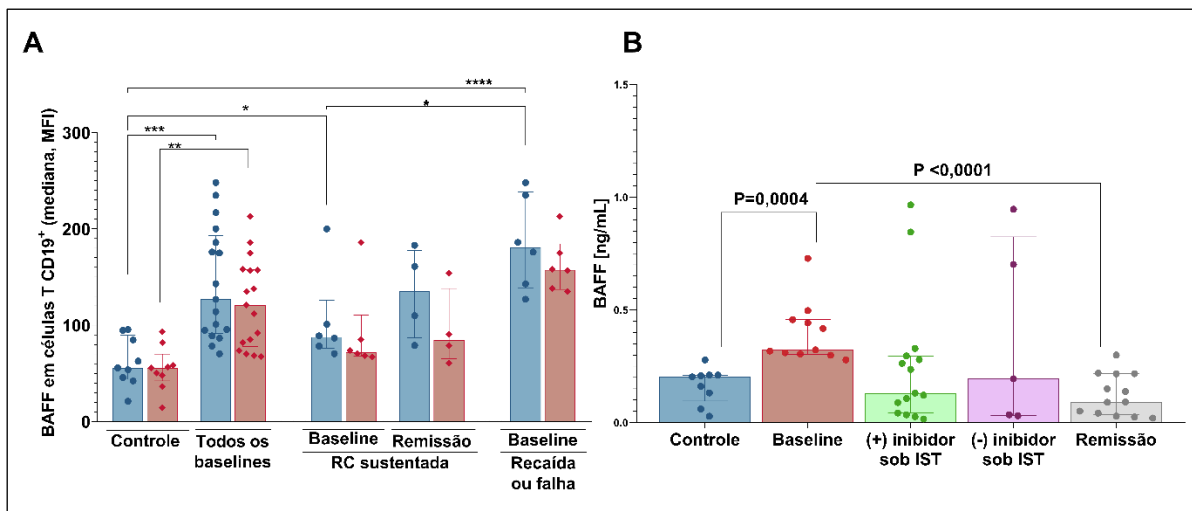


Figura 17. Expressão de BAFF em pacientes com com hemofilia A adquirida. A) Expressão intracelular de BAFF. Os círculos azuis expressam os grupos que não receberam nenhum estímulo durante a cultura, e os losangos vermelhos representam os grupos de células estimuladas com rFVIII por 24 horas. **B)** Níveis séricos de BAFF em pacientes com hemofilia A adquirida e indivíduos saudáveis (controles). *P = 0,05; ***P = 0,001; ****P < 0,0001. Teste de *Mann-Whitney*.

Ao avaliarmos a expressão intracelular de APRIL por citometria de fluxo, observamos que sua frequência também se encontra aumentada ao *baseline* das células dos pacientes com HAA (figura 18A), entretanto não observamos diferenças significativas nos níveis de APRIL ao comparar os grupos de pacientes que alcançaram RC sustentada com os pacientes que falharam ou recaíram ao tratamento. Além disso, investigamos os níveis circulantes de APRIL no plasma de pacientes em diferentes momentos, incluindo ao *baseline*, durante o tratamento e na remissão. Não foi possível encontrar alterações significativas nos níveis circulantes de APRIL ao comparamos com controles saudáveis (Figura 18B).

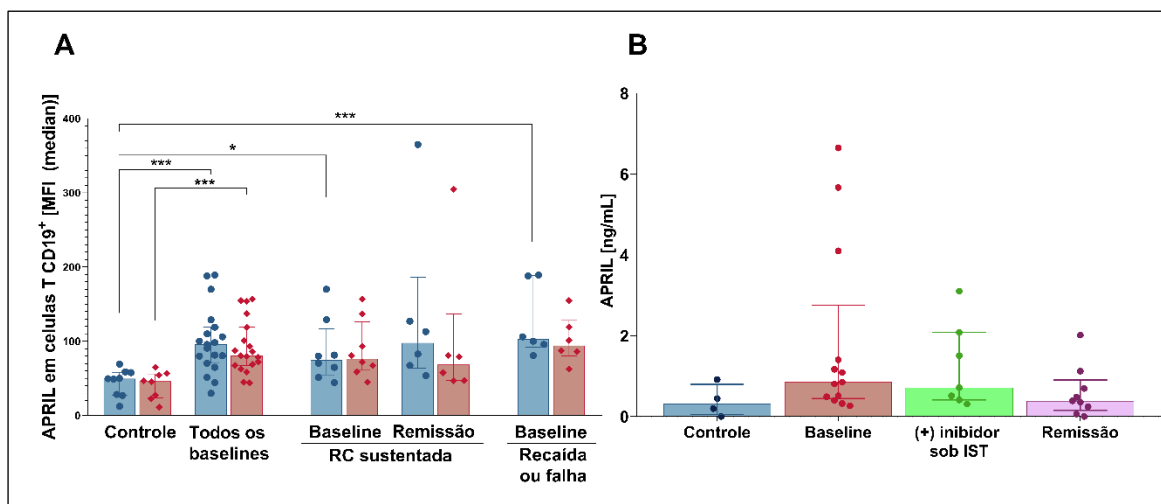


Figura 18. Expressão de APRIL em pacientes com hemofilia A adquirida. A) Expressão intracelular de APRIL. As PBMCs foram cultivadas com meio RPMI por 24 horas, e a expressão de APRIL em linfócitos CD19⁺ foi analisada em citômetro FACSCalibur de quatro canais. Os círculos azuis expressam os grupos que não receberam nenhum estímulo durante a cultura, e os losangos vermelhos representam os grupos de células estimuladas com rFVIII por 24 horas. **B)** Níveis séricos de APRIL em pacientes com hemofilia A adquirida e indivíduos saudáveis (controles). *P = 0,05; ***P = 0,001; ****P < 0,0001. Teste de *Mann-Whitney*.

5.2.5. Análise da produção de citocinas de acordo com a etiologia

As figuras 19 e 20 representam as análises realizadas de acordo com os subgrupos de cada categoria. Os pacientes foram agrupados de acordo com a etiologia que desencadeou a HAA, e subgrupadas entre as amostras que correspondem ao baseline e as amostras que correspondem a remissão. Por se tratar de uma casuística pequena, embora análises de subgrupos tenham sido realizadas, os resultados não possibilitaram interpretar se o perfil de citocinas avaliado durante o estudo poderia ter uma dependência direta da doença de base (como a autoimunidade desencadeada primariamente devido outras patologias, como infecção viral, malignidade, etc.).

Ao comparar a expressão do controle com as citocinas IL-17a, TGF- β , BAFF e APRIL, foi possível observar diferença significativa entre os pacientes idiopáticos, e os pacientes que desenvolveram HAA devido outra autoimunidade. O que sugere que a elevação dessas citocinas não é característica especificamente de uma doença subjacente, mas sim que está associada com a fisiopatologia da doença.

Entretanto, por não ser possível observar diferenças entre os subgrupos, não conseguimos identificar um fator preditor ou um possível biomarcador que esteja associado com a etiologia subjacente da HAA.

Devido a pequena casuística, não foi possível realizar outras análises de subgrupo (como grupos de idade, por exemplo), já que o número de indivíduos que participaram desse estudo é limitado.

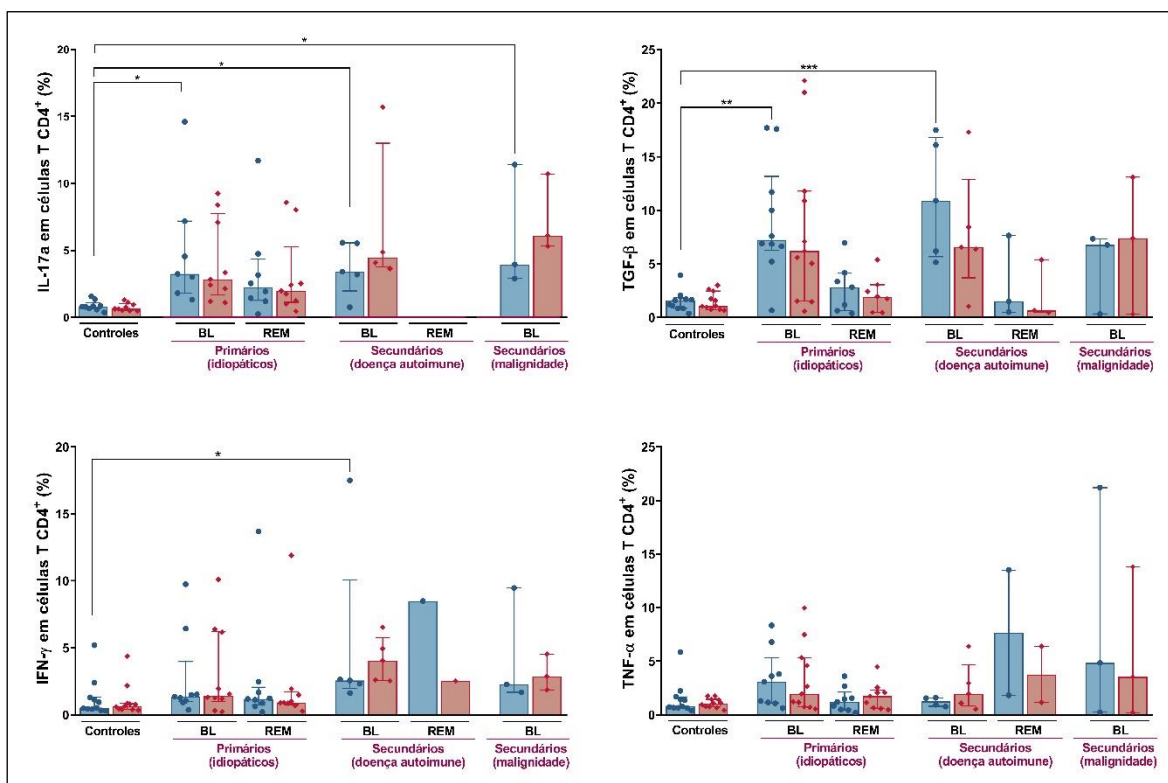


Figura 19. Análise da produção de citocinas em pacientes com HAA de acordo com a etiologia da doença (IL-17a, TGF-β, IFN-γ e TNF-α). Os pacientes foram agrupados de acordo com a etiologia subjacente da doença. Grupos de puerpério, imunodeficiência adquirida severa combinada e infecção viral não foram representados devido N insuficiente para as análises estatísticas. Alguns grupos (como a remissão dos pacientes secundários a doença autoimune) não foram avaliados estatisticamente, também devido ao número insuficiente de amostras para as análises estatísticas. *P = 0,05; ***P = 0,001. Teste de *Mann-Whitney*.

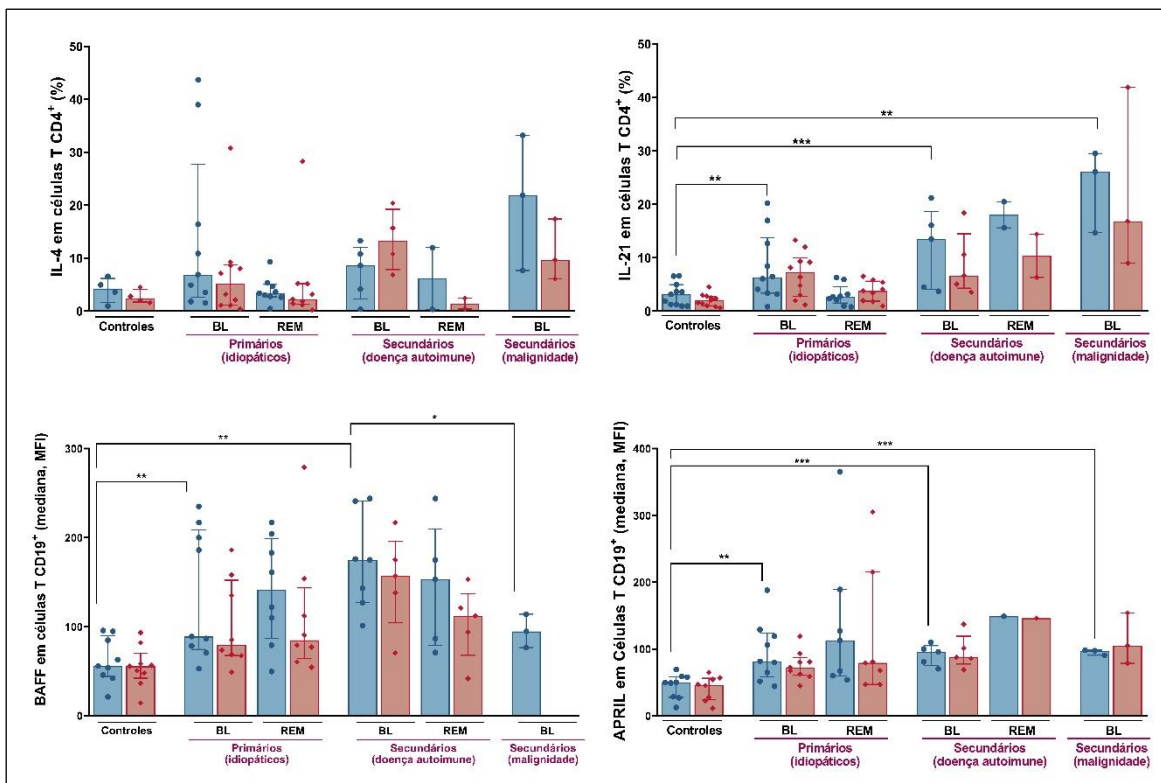


Figura 20. Análise da produção de citocinas em pacientes com HAA de acordo com a etiologia da doença (IL-4, IL-21, BAFF e APRIL). Os pacientes foram agrupados de acordo com a etiologia subjacente da doença. Grupos de puerpério, imunodeficiência adquirida severa combinada e infecção viral não foram representados devido N insuficiente para as análises estatísticas. Alguns grupos (como a remissão dos pacientes secundários a doença autoimune) não foram avaliados estatisticamente, também devido ao número insuficiente de amostras para as análises estatísticas. *P = 0,05; ***P = 0,001. Teste de *Mann-Whitney*.

5.2.6. Análises de correlação entre imunoglobulinas e perfil das citocinas

A produção de imunoglobulinas anti-FVIII (quantificada anteriormente por nosso grupo) foi correlacionada com o perfil das citocinas.

Primeiramente, foi realizada análise de correlação entre as imunoglobulinas e citocinas de todos os pacientes, independentemente do desfecho observado após o tratamento. Como pode ser observado na figura 21, foi possível observar uma correlação moderada entre a produção de IgA anti-FVIII com IL-17a, ($r = 0,52$; $P = 0,02$) e TGF- β ($r = 0,57$; $P = 0,02$), e uma correlação moderada entre a produção de IgG1 anti-FVIII com BAFF ($r = 0,59$; $P = 0,009$) e APRIL ($r = 0,47$; $P = 0,04$).

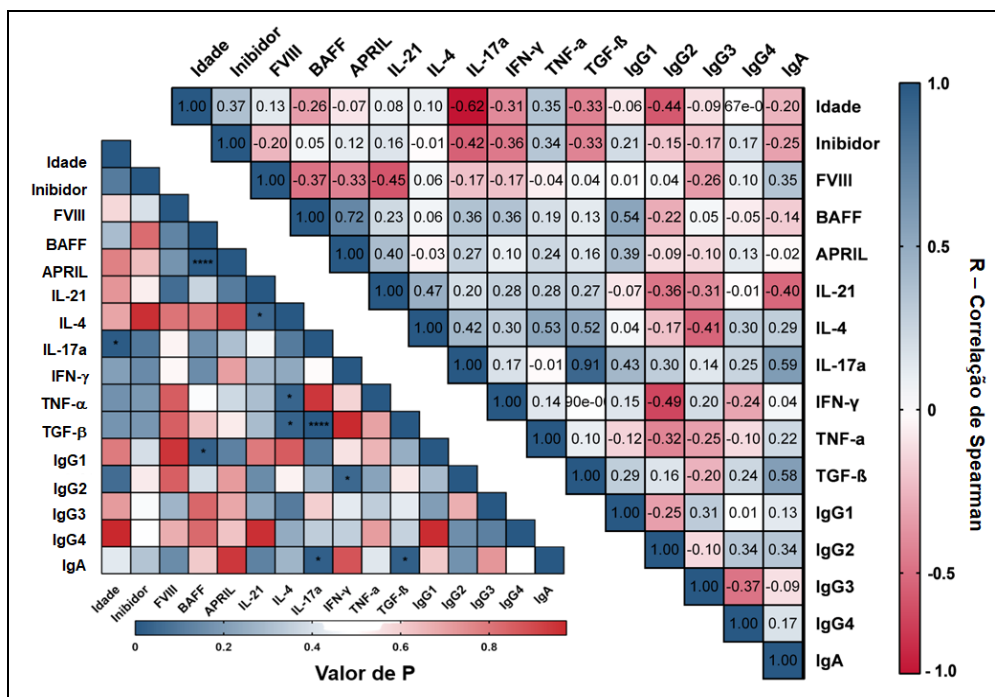


Figura 21. Correlação entre os títulos de anticorpos de imunoglobulinas anti-FVIII e citocinas de todos os pacientes com HAA. Para essas análises, foram utilizadas as informações do baseline de todos os pacientes, independente do desfecho. Matriz de correlação representativa das análises de todos os grupos de pacientes durante todo o seguimento do estudo. * $P = 0,05$; *** $P = 0,001$; **** $P < 0,0001$.

Além disso, foi realizada a análise de correlação entre a produção de imunoglobulinas anti-FVIII e a frequência de citocinas no grupo de pacientes que recaiu ou falhou ao tratamento imunossupressor durante o *baseline*, onde foi possível observar uma correlação forte entre a produção de IgG4 e IL-4 ($r = 0,96$; $P = 0,0001$) e IL-21 ($r = 0,964$; $P = 0,0001$), sugerindo que no cenário da HAA, o aumento na produção de IL-4 esteja ocorrendo de forma dependente da expressão de IL-21. De forma exploratória, no grupo de pacientes que recaiu ou falhou ao tratamento imunossupressor (figura 22), observamos que a produção de IgG4-anti FVIII acompanha o aumento da expressão das principais citocinas que a literatura associa com a produção de IgG4, conforme anteriormente discutidas anteriormente nesse trabalho (IL-4 e IL-21). Isso sugere, que a persistência dos autoanticorpos nesses pacientes poderia ser mediada pelo aumento dessa via de sinalização.

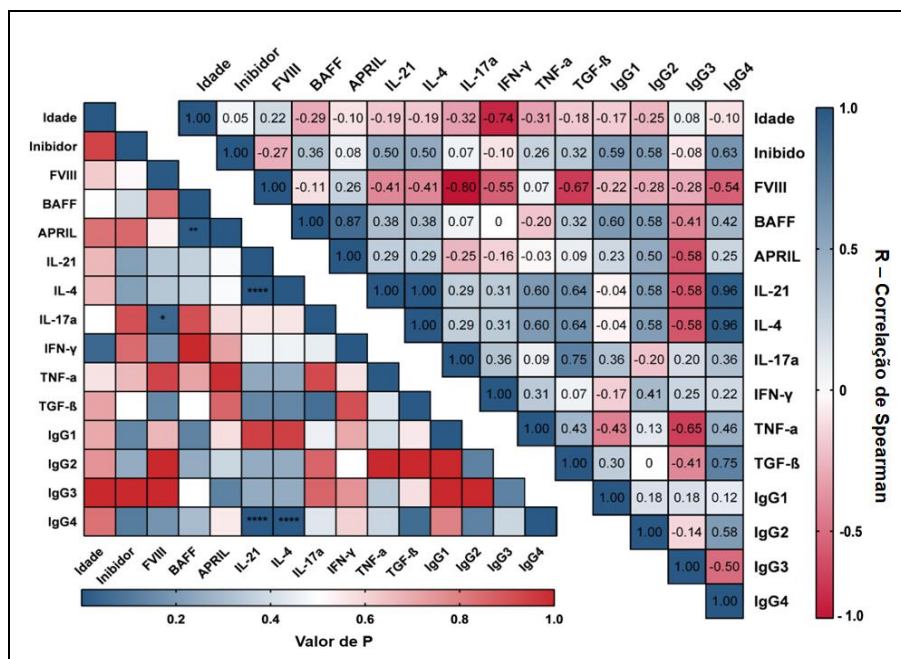


Figura 22. Correlação entre os títulos de imunoglobulinas anti-FVIII e citocinas de pacientes com HAA que recaíram ou falharam ao tratamento imunossupressor. Para essas análises, foram utilizadas as informações do baseline dos pacientes que recaíram ou falharam a terapia imunossupressora. Matriz de correlação representativa das análises do grupo de pacientes que recaiu ou falhou ao tratamento imunossupressor. *P = 0,05; ***P = 0,001; ****P < 0,0001.

6. DISCUSSÃO

Esse estudo apresenta pela primeira vez uma análise longitudinal extensa do perfil de citocinas e sua correlação com o desfecho e resposta ao tratamento de pacientes com diagnóstico de HAA, provenientes de um único centro de referência ao longo de oito anos de seguimento. Embora a análise seja feita em um número limitado de casos, os dados apresentados são importantes considerando a raridade e gravidade da doença.

Buscando analisar o comportamento imune celular na HAA, observamos a produção das principais citocinas de assinatura dos diferentes perfis de linfócitos T. A IL-17a é uma citocina produzida caracteristicamente pelas células Th17 e apresentou-se elevada ao diagnóstico dos pacientes, independente dos desfechos e resposta ao tratamento imunossupressor. As células Th17 são amplamente descritas por estarem relacionadas com a manifestação de doenças autoimunes (106). Além disso, as células Th17 também secretam outras citocinas e quimiocinas

pró-inflamatórias, incluindo a IL-6 e IL-21. A literatura demonstra que o TGF- β é muito importante na diferenciação de dois grupos celulares, Th17 e Tregs, atuando de maneiras antagônicas de acordo com o estímulo recebido (61). Portanto, além da IL-6 e IL-17a, a ativação e estabilização eficiente das células Th17 dependerá da produção de TGF- β , IL-21 e IL-23 (107,108). Nesse estudo, observamos um aumento na frequência de TGF- β e IL-21 nos mesmos momentos que as IL-17a estava elevada. A ativação dessas citocinas gera um *looping* de amplificação de sinal, o que permite o aumento da propagação da resposta inflamatória e autoimune (109).

Ao correlacionar a produção de imunoglobulinas com a frequência das citocinas analisadas ao diagnóstico de todos os pacientes do estudo, embora apenas dois pacientes apresentaram positividade para IgA, foi possível observar uma correlação moderada entre a produção de IgA e IL-17a ($r = 0,59$; $P = 0,01$) e TGF- β ($r = 0,57$; $P = 0,02$), e maiores estudos podem ajudar a compreender melhor uma possível participação das células Th17 na produção de IgA em pacientes com HAA. As células Th17 são capazes de promover a troca de classe para IgA em uma resposta T-dependente. A produção de IL-17, TGF- β e IL-6 já foi associada com os aumentos dos níveis de IgA na fisiopatologia de artropatias inflamatórias, como a artrite reumatoide, onde foi observado que essas citocinas possam contribuir com o aumento do quadro inflamatório nas articulações (110). Além disso, um estudo demonstrou que a presença de IgA pode estar associada com um mau prognóstico em pacientes com HAA (104). Embora esse dado não tenha sido confirmado em estudos de outros grupos (9), os dados observados em nosso estudo levantam a hipótese de que células Th17 patogênicas possam estar envolvidas na indução da produção de IgA de alta afinidade, e mais estudos podem futuramente determinar relação entre a ativação de células Th17 e o mau prognóstico de pacientes com HAA que produzem IgA.

Na avaliação da presença de células Tregs não foi possível observar nenhuma diferença significativa entre os grupos de pacientes com HAA e indivíduos saudáveis. Portanto, descartamos a ação das Tregs na quebra da tolerância imunológica em nosso estudo, sugerindo outro modelo para autoimunidade.

Os linfócitos auxiliares foliculares (Tfh) são subtipos de linfócitos CD4⁺ que participam na regulação do desenvolvimento da imunidade humoral e essa

população linfocitária é caracterizada por facilitar a resposta das células B-dependente de células T (111). Embora as células Tfh sejam inicialmente descritas como essenciais na produção de células de memória, estudos mais atuais associam a ação dessas células na proliferação e geração de células B autorreativas, o que resulta na produção de autoanticorpos (112). A interleucina clássica secretada pelas células Tfh é a IL-21 e sequencialmente, essas células adquirem o potencial de secretar também IL-4 (113). Como discutido anteriormente, além das células Tfh, a IL-21 também pode ser secretada pelas células Th17 e é uma citocina conhecida por auxiliar no processo de estabilização e amplificação do sinal que as células Th17 emitem. Além disso, a IL-21 encontra-se fortemente associada com a regulação de produção e secreção de anticorpos pelas células B (114,115).

Ao correlacionar a frequência de IL-21 com a IL-4 nos pacientes com HAA, de acordo com seu desfecho clínico, observamos uma forte correlação com o grupo de pacientes falharam ou recaíram ao tratamento ($r = 0,90$; $P = 0,0007$; $R^2 = 0,82$) e nenhuma associação com os pacientes que evoluíram com RC sustentada. Isso sugere que a IL-4 pode estar influenciando na persistência do inibidor.

Embora alguns estudos relacionados com a ocorrência de inibidor e resposta à indução de imunotolerância (ITI) em pacientes e modelo animal para hemofilia A congênita, nosso estudo avalia a IL-21 pela primeira vez em pacientes com HAA. Um estudo realizado com modelo murino de FVIII *knockout* (FVIII KO), demonstrou que o desenvolvimento de aloanticorpos na HA depende criticamente da indução de células Tfh ativadas, uma vez que foi possível notar elevada produção de células Tfh no baço de camundongos que desenvolveram inibidor ao FVIII (114). Além disso, dados anteriores do nosso grupo demonstraram que a produção de IL-21 apresenta uma modulação diferenciada em pacientes com HA que falharam à terapia imunossupressora. Um estudo de caso recentemente publicado também propõe a ação potencial da IL-21 em pacientes com HA que produzem anticorpos, onde os autores sugerem que essa interleucina seja responsável pela inibição das células T regulatórias e indução da diferenciação das células T efetoras, e produção de IgG4 (116).

Os elevados níveis de IL-21 que observamos nos pacientes com HAA pode ser um indicativo de que esse mecanismo também esteja ocorrendo na

fisiopatologia da produção de autoanticorpos ao FVIII. Outra associação importante dos efeitos da IL-21 na produção de anticorpos foi demonstrada em estudos *in vitro*, que observaram a capacidade das células Tfh em exercer plasticidade e produzir células IL-21⁺ IL-4⁺, que podem facilitar a indução da produção de subclasses específicas de imunoglobulinas nas zonas germinativas (111). Ademais, estudos sugerem que o efeito da IL-21 na troca de classe da IgG pode ser amplificado pela adição de IL-4 (115), e que a IL-4 na presença de IL-21 está associada como fator de severidade em diferentes doenças, como por exemplo, em caso de pacientes com imunodeficiência severa combinada, devido produção elevada de IgG (117).

Embora a produção de IL-4 possa ocorrer em diferentes tipos celulares, incluindo as células Tfh, essa citocina é a fonte dominante da resposta de anticorpos do tipo 2 e produzida via diferenciação e ativação de células Th2 (118,119). Interessante notar que em nosso estudo, embora a IL-21 estivesse aumentada em todos os pacientes com HAA ao diagnóstico, a IL-4 foi alimentada apenas no grupo de pacientes com falha ou recaída. Embora não tenha sido possível em nosso estudo descartar que as Tfh também contribuíram para a produção aumentada de IL-4, a observação dessa citocina em relação ao desfecho e não da IL-21, reforça a possibilidade que as células Th2 estejam mais relacionadas com esse aumento.

As citocinas de assinatura das células (118,119) Th1 compreendem o IFN- γ , o TNF- α e a IL-2 (120). Para manutenção da homeostasia, as células Th1 auxiliam na mediação da resposta imune durante a inflamação, e participam nos mecanismos de hipersensibilidade tardia (tipo IV). O IFN- γ é uma citocina muito importante na fisiopatologia da autoimunidade de diferentes doenças como, por exemplo, o LES, que de acordo com autores, encontra-se relacionado com a capacidade que o IFN- γ possui para mediar a autorreatividade de linfócitos B e ocasionar a produção de autoanticorpos encontrados na progressão da doença (121).

Estudos em animais demonstraram que a sinalização do IFN- γ , incluindo a ativação de seu receptor (IFN- γ R) e níveis elevados do fator de transcrição STAT-1, são essenciais para o desenvolvimento de centros germinativos espontâneos que abrigam células B autorreativas, e levam à geração de autoanticorpos patogênicos, promovendo a autoimunidade (122). Além disso, um estudo piloto

realizado com PBMCs de três pacientes com HAA sugere levemente que as citocinas IFN- γ e LT β (TNF-c) poderiam ser utilizadas como marcadores preditores da resposta ao tratamento com glicocorticoides. Os autores do estudo chegaram a essa conclusão, após observarem a redução dos níveis de IFN- γ e LT β em dois pacientes que responderam à terapia imunossupressora, enquanto o paciente que não obteve resposta ao tratamento permaneceu com níveis elevados das citocinas em questão (123).

O TNF- α é uma citocina da superfamília do TNF (TNFSF), que além de estar associada a diferentes processos de defesa contra invasores e a manutenção da homeostasia, também se encontra envolvida na modulação de diferentes vias de sinalização relacionadas a processos inflamatórios severos, incluindo a artrite reumatoide (124,125). Receptores específicos do TNF podem induzir sinais de sobrevivência que são capazes de manter diferentes tipos celulares ativados, incluindo as células Tfh, que resultam na amplificação da ligação CD40-CD40L, e podem induzir a ativação de células B autorreativas, levando à produção de autoanticorpos pela ação da citocina fator de ativação de células B (BAFF), que se liga aos receptores TACI, BCMA e BAFF-R nos linfócitos B (125).

Curiosamente, tanto a produção de IFN- γ quanto os níveis de TNF- α foram observados aumentados apenas ao diagnóstico do grupo que recaiu ou falhou ao uso de imunossupressão. Esses dados nos sugerem que os linfócitos Th1 possuem um papel importante na modulação dos mecanismos fisiopatológicos que estão relacionados com a resposta à terapia imunossupressora de pacientes com HAA e com a persistência da produção de autoanticorpos que observamos no grupo recaída/falha.

A maioria das células B autorreativas são removidas do repertório de desenvolvimento de linfócitos por processos de seleção negativa, envolvendo deleção, edição de receptor ou indução de anergia (126). Portanto, dentre os diferentes processos postulados para o desenvolvimento de doenças autoimunes, está a quebra de mecanismos de tolerância central e periférica, incluindo defeitos nos processos de seleção positiva e negativa, edição de receptores, falha nos mecanismos de supressão (pelas células regulatórias) e a autorreatividade dos linfócitos B, o que inclui modificações na sinalização do BCR e outros mediadores solúveis, como citocinas específicas (127). Como não encontramos diferenças

entre a produção de células B regulatórias (IL10⁺ CD19⁺ CD24⁺ CD38⁺) na nossa população do estudo ao compararmos com indivíduos saudáveis, partimos para o pressuposto de que outro mecanismo de indução da autorreatividade de linfócitos B, relacionados com a quebra da tolerância imunológica poderia estar comprometido em nosso modelo de estudo.

Um dos mecanismos de autorreatividade de células B inclui a ativação exacerbada do BCR, que pode acontecer tanto pelo maior estímulo entre CD40-CD40L, quanto pelo aumento da expressão de mediadores que aumentam os sinais de sobrevivência nos linfócitos B, como por exemplo duas importantes citocinas da TNFSF, a BAFF e a APRIL (75,128–130).

Essas citocinas são descritas como reguladoras da diferenciação de células B na homeostase normal e em distúrbios autoimunes (126). A BAFF está envolvida na seleção de células autorreativas em doenças como o LES e a Síndrome de Sjögren (131). Além disso, o aumento nos níveis de BAFF também é associado com a fisiopatologia da artrite reumatoide (132). De todo modo, é muito importante que exista equilíbrio entre a produção dessas citocinas para uma resposta imune eficiente. Um exemplo é dado pela eliminação total da BAFF e APRIL em estudos, onde ocorre a redução das funções regulatórias e imunossupressoras, aumentando o quadro patológico na esclerose múltipla (133).

Em nosso estudo observamos um aumento na produção de BAFF em células B CD19⁺ em comparação de células de indivíduos saudáveis. As culturas de células dos pacientes que falharam ou recaíram pelo menos uma vez à terapia imunossupressora, apresentam ao diagnóstico, níveis de BAFF ainda maiores do que os pacientes que alcançaram remissão completa sustentada. Além disso, procuramos detectar os níveis circulantes de BAFF no plasma de pacientes com HAA ao diagnóstico. Nesse caso, as concentrações de BAFF também se mostraram estatisticamente maiores ao comparar com indivíduos saudáveis.

A literatura demonstrou que a BAFF produzida por monócitos pode ser ativada pelo IFN- γ em modelo animal, de modo independente da ativação de linfócitos T, e que o IFN- γ na presença de BAFF induz uma robusta ativação de linfócitos B (134). Outro estudo aponta que após a ativação do IFN- γ via BAFF, ocorre uma superativação da BAFF em células mieloides, que formam um *looping* inflamatório em modelo animal para LES. Nesse estudo, os autores sugerem que esse *looping*

inflamatório induza a liberação de IFN- γ pelos linfócitos T, contribuindo para a autoimunidade (135).

Embora esse modelo não nos permita determinar uma relação de causa-efeito entre a produção de IFN- γ e BAFF por meio da regressão linear, encontramos de forma exploratória uma fraca correlação entre a expressão de IFN- γ e BAFF ($r = 0,366$; $P = 0,03$). Acreditamos que com um número amostral maior, essa correlação possa ser evidenciada.

Outras citocinas, como a IL-2, IL-4, IFN- γ e TNF- α , que encontramos aumentadas, principalmente no grupo de pacientes que recaíram ou falharam ao tratamento, também foram reportadas com efeito de auxiliarem o aumento da expressão de BAFF em outros modelos de doença. Gui e colaboradores (2016) descreveram que essas citocinas aumentam a viabilidade celular em linfoma de células B pela ativação da via de sinalização Erk1/2 e S6K1, em modelo animal. Os autores sugerem que essas citocinas podem alvos terapêuticos para auxiliar na prevenção de doenças malignas induzidas por BAFF (136).

Até o momento, o entendimento sobre os processos que desencadeiam a imunogenicidade na HAA ainda é restrito. No entanto, a literatura tem demonstrado que os mecanismos de autoimunidade podem ser semelhantes aos mecanismos de aloimunidade anti-FVIII, observados na HA (137). Portanto, algumas respostas observadas são associadas ao que a literatura demonstra ocorrer na HA. Interessante observar que um estudo realizado com pacientes com HA demonstrou que a BAFF se encontra elevada em pacientes que recaíram ou falharam ao tratamento de ITI. O estudo em questão, observou pacientes pediátricos com hemofilia A que desenvolveram inibidores contra o FVIII exógeno e foi capaz de correlacionar os níveis elevados de BAFF com a produção de IFN- γ e IL-2. Os autores hipotetizaram que os níveis de BAFF possam estar elevados antes mesmo que os pacientes desenvolvam inibidor, e que a BAFF atue como um possível adjuvante do FVIII nos mecanismos de produção de inibidor (138). Outro trabalho publicado recentemente investigou 100 crianças com HA e demonstrou que pacientes com polimorfismo no alelo *BAFF* rs9514828 apresentam risco maior para desenvolvimento de inibidor, e sugerem que os níveis elevados de BAFF podem ser utilizados como um marcador prognóstico útil para o desenvolvimento de inibidores em crianças com HA (139). Além disso, é importante notar que há mais

de dez anos há medicamentos, como belimumabe, um anticorpo monoclonal anti-BAFF, que tem sido usado com sucesso em doenças autoimunes como LES (140). Portanto, é possível que a HAA também possa se beneficiar no uso de drogas alvo específicas, como belimumabe.

Apenas um estudo com HAA e BAFF foi encontrado na literatura, onde a BAFF foi mensurada em dois pacientes e níveis elevados foram encontrados em um paciente, enquanto no outro paciente os níveis de BAFF estavam normais. Os autores do trabalho em questão sugeriram que a BAFF poderia estar envolvida na patogênese da HAA, se não em todos os pacientes, pelo menos em alguns (141). Em nosso estudo, como a casuística observada na análise do grupo recaída/falha é muito menor do que a casuística do estudo todo, essas informações precisam ser avaliadas com bastante cautela. De forma exploratória, no grupo de pacientes que recaiu ou falhou ao tratamento imunossupressor, observamos que a produção de IgG4 anti-FVIII acompanha o aumento da expressão das principais citocinas que a literatura associa com a produção de IgG4 e que foram discutidas anteriormente nesse trabalho (IL-4, IL-21), o que poderia indicar que a persistência dos autoanticorpos nesses pacientes poderia ser mediada pelo aumento dessa via de sinalização.

A principal limitação de nosso estudo está relacionada com o número limitado de casos incluídos. Ademais, observamos uma variação demográfica da população (que abrangeu pacientes de 3 até 79 anos) e a existência de características clínicas que podem ser potenciais confundidores para os dados obtidos. No entanto, é importante ressaltar que se trata de uma doença rara e nesse caso, não apenas pudemos seguir os pacientes em um único centro, com certa uniformidade de conduta e por um longo período, o que torna esse estudo único em sua complexidade.

Além disso, nossos dados possuem a mesma qualidade que as publicações disponíveis sobre o assunto, apresentando um panorama importante sobre a evolução da HAA e pode ser de grande relevância para compreensão da fisiopatologia da doença, contribuindo para a determinação de possíveis preditores de gravidade e resposta ao tratamento, além de auxiliar em possíveis alvos para novas terapias.

7. CONCLUSÕES

Com esse estudo pudemos observar que os mecanismos imunológicos na HAA são complexos e ainda necessitam de maior investigação. A partir dos dados coletados, foi possível compreender que a resposta imune celular que leva ao desenvolvimento de inibidor é coordenada pelo recrutamento de diferentes subpopulações de linfócitos, e que as citocinas produzidas por esses linfócitos possuem correlação entre a produção de imunoglobulina anti-FVIII desses pacientes.

De modo geral, pacientes com HAA apresentam uma correlação moderada entre a expressão de IL-17A e IgA, que pode indicar a ação de células Th17 patogênicas na fisiopatologia da doença. Por outro lado, pacientes que recaíram ou falharam ao tratamento imunossupressor apresentaram uma forte correlação entre a produção de IgG4 e as interleucinas IL-4 e IL-21, o que sugere o envolvimento de células Tfh como possível mecanismo de persistência do inibidor.

Ademais, nossos dados sugerem que pacientes que alcançaram remissão completa sustentada e não recaíram após o tratamento possuem prioritariamente, uma ativação de células Tfh e Th17. Por outro lado, pacientes que recaíram ou falharam à terapia imunossupressora e apresentam persistência do inibidor, além da ativação de linfócitos Tfh e Th17, também apresentaram ativação de células do tipo Th1. Além disso, o aumento significativo na produção de BAFF, IL-4, TNF- α e IFN- γ apenas no grupo de recaída/falha sugere um papel de potenciais preditores para a resposta à terapia imunossupressora na HAA.

8. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA DA ALUNA DURANTE A PÓS-GRADUAÇÃO

8.1 Relativa à tese

8.1.1. Apresentação de trabalhos em congressos

Hemo 2021 Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular (HEMO). São Paulo, Brasil, 26 a 29 de outubro de 2022.

Frade-Guanaes JO, Racanelli AP, Siqueira LH, Costa-Lima C, Medina SS, Foschi NM, Colella MP, Montalvão SAL, Yamaguti-Hayakawa GG, Ozelo MO. Expressão de BAFF (B-cell activating factor) e resposta Th2 em pacientes com recaída na Hemofilia A Adquirida. Em: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2021, Online. (**Pôster**)

ASH 2021 63th ASH Annual Meeting and Exposition in Atlanta, GA, 11 a 14 de dezembro de 2021.

Frade-Guanaes JO, Racanelli AP, Siqueira LH, Costa-Lima C, Medina SS, Foschi NM, Colella MP, Montalvão SAL, Yamaguti-Hayakawa GG, Ozelo MO. Acquired hemophilia A relapse is related to Th2 response, and increased expression of B-cell activating factor (BAFF). In: American Society of Hematology Meeting, 2021, Georgia. Blood, 2021. v. 138 p. 497. (Travel grant, **Apresentação oral**)

ISTH 2022 XXX Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). Londres, Reino Unido, 09 a 13 de julho 2022.

Frade-Guanaes J, Racanelli A, Siqueira L, Costa-Lima C, Medina S, Foschi N, De Lima L, Francisco A, Colella M, Montalvão S, Yamaguti-Hayakawa G, Ozelo M. Cytokine profile of patients with Acquired Hemophilia A (AHA) in a longitudinal study [[abstract](#)]. In: International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2022, London UK. (ISTH Reach the World Award, **Apresentação oral**)

Hemo 2022 Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular (HEMO). São Paulo, Brasil, 26 a 29 de outubro de 2022.

Frade-Guanaes JO, Racanelli AP, Siqueira LH, Costa-Lima C, Medina SS, Foschi NM, Colella MP, Montalvão SAL, Yamaguti-Hayakawa GG, Ozelo MO.

Perfil de citocinas produzidas em pacientes com hemofilia A adquirida em um estudo longitudinal. Em: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2022, São Paulo. (**Apresentação oral**)

8.2 Geral

8.2.1 Artigos científicos

Prezotti ANL, Frade-Guanaes JO, Yamaguti-Hayakawa GG, Ozelo MC. Immunogenicity of Current and New Therapies for Hemophilia A. *Pharmaceuticals* (Basel). 2022 Jul 23;15(8):911. <https://doi.org/10.3390/ph15080911>

Del Rio APT, **Frade-Guanaes JO**, Ospina-Prieto S, Duarte BKL, Bertolo MB, Ozelo MC, Sachetto Z. Impaired repair properties of endothelial colony-forming cells in patients with granulomatosis with polyangiitis. *Journal Of Cellular and Molecular Medicine* (Print), v. 00, p. 1-10, 2022. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17531>

Lopes-Pires ME, **Frade-Guanaes JO**, Quinlan GJ. Clotting Dysfunction in Sepsis: A Role for ROS and Potential for Therapeutic Intervention. *Antioxidants* (Basel). 2021 Dec 30;11(1):88. [doi:10.3390/antiox11010088](https://doi.org/10.3390/antiox11010088)

Naime ACA, **Frade-Guanaes JO**, Lopes-Pires ME. Sepsis: The Involvement of Platelets and the Current Treatments. *Curr Mol Pharmacol*. 2018;11(4):261-269. doi: [10.2174/1874467211666180619124531](https://doi.org/10.2174/1874467211666180619124531)

8.2.2 Apresentação de trabalhos e palestras em congressos

1. **Frade-Guanaes JO**, Ospina-Prieto S, Siqueria LH, Ozelo MC. SHIP-1 expression in Wiskott-Aldrich Syndrome patients. Em: Immunotherapy 2019 - XLIV Congress of the Brazilian Society of Immunology. Florianópolis, Brasil, 29 de outubro a 02 de novembro de 2019. (Pôster)

2. Ospina-Prieto S, Duarte BKL, **Guanaes, JFO**; Costa FF; Ozelo MC; Endothelial Colony-Forming Cells (ECFC) as an Autologous Model for Studying Endothelial Pathophysiology in Sickle Cell Anemia and Myeloproliferative Neoplasms. In: American Society of Hematology Meeting, 2018, San Diego. Blood, 2018. v. 132. p. 74. (Apresentação oral, travel grant for Ospina-Prieto S)
3. Duarte BKL, Ospina-Prieto S, Siqueira LH, **Guanaes JFO**, Costa FF, Ozelo MC. The Pro-Adhesive and Reduced Angiogenic Properties of Endothelial Colony Forming Cells (ECFC) from JAK2V617F MPN Patients Are Not Related to the Expression of the JAK2 mutation in These Cells: A Potential Role of ADAM17. In: American Society of Hematology Meeting, 2019, Orlando. Blood, 2019. v. 134. p. 3618. (Apresentação de poster, travel grant for Duarte BKL)
4. Saez RC, Yamaguti-Hayakawa GG, Duarte BKL, **Guanaes JOF**, Ospina-Prieto S, Medina SS, Costa FF, Ozelo MC. Sickle Cell Disease Patients under Regular Transfusion Program Have Decreased *in-vitro* Platelet Aggregation. In: Society on Thrombosis and Haemostasis, 2017, Berlin. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
5. Yamaguti-Hayakawa GG, Ricciardi J, FaiottoV, Feldberg G, Sakuma E, **Frade-Guanaes J**, Lima L, Paulo D, Garcia W, Sambo AAL, Hosokawa M, Sthal V, De Souza Medina S, Colella M, Foschi N, Costa-Lima C, Ozelo MC. Musculoskeletal health after gene therapy for haemophilia A: A three-year follow-up longitudinal study. In: WFH Comprehensive Care Summit, 2023, Buenos Aires. Haemophilia. Cambridge: WILEY, 2023. v. 29. p. 40-41.
6. Del Rio APT, **Frade JO**, Prieto SO, Duarte BKL, Bertolo MB, Ozelo MC, Sachetto Z. Granulomatosis With Polyangiitis: Impairment Of Endothelial Cell Function And Its Role In Vascular Repair. In: 36º Congresso Brasileiro de Reumatologia, 2019, Fortaleza. Blucher Medical Proceedings. São Paulo: Editora Blucher, 2019. p. 461.
7. Del Rio APT, **Frade JO**, Prieto SO, Duarte BKL, Bertolo MB, Ozelo MC, Sachetto Z. Endothelial Progenitor Cells in Anca-Associated Vasculitis. In: 36º Congresso Brasileiro de Reumatologia, 2019, Fortaleza. Blucher Medical Proceedings, 2019. p. 419.

8.2.3 Artigos em fase de revisão para submissão

Racanelli-Bovo AP, **Frade-Guanaes JO**, Francisco AP, Elidio PS, Montalvão SAL, Yamaguti-Hayakawa GG, Collela MP, Ozelo MC. Longitudinal evaluation of immunoglobulins anti-factor VIII profile in patients with Acquired Hemophilia A (AHA).

Frade-Guanaes JO, Racanelli-Bovo AP, Francisco AP, Elidio PS, Montalvão SAL, Yamaguti-Hayakawa GG, Collela MP, Ozelo MC. Cytokine profile of patients with Acquired Hemophilia A (AHA) in a longitudinal study.

9 REFERÊNCIAS

1. Cohen AJ, Kessler CM. Acquired inhibitors. *Baillieres Clin Haematol.* junho de 1996;9(2):331–54.
2. Collins PW, Hirsch S, Baglin TP, Dolan G, Hanley J, Makris M, et al. Acquired hemophilia A in the United Kingdom: a 2-year national surveillance study by the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation. *Blood* [Internet]. 2007;109:1870–7. Disponível em: www.bloodjournal.org
3. Knoebl P, Marco P, Baudo F, Collins P, Huth-Kühne A, Nemes L, et al. Demographic and clinical data in acquired hemophilia A: Results from the European Acquired Haemophilia Registry (EACH2). *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* abril de 2012;10(4):622–31.
4. Poston JN, Kruse-Jarres R. Advances in Acquired Hemophilia A. *Transfus Med Rev.* 1º de outubro de 2022;
5. Borg JY, Guillet B, Le Cam-Duchez V, Goudemand J, Lévesque H. Outcome of acquired haemophilia in France: the prospective SACHA (Surveillance des Auto antiCorps au cours de l'Hémophilie Acquise) registry. *Haemophilia.* julho de 2013;19(4):564–70.
6. Green D. Factor VIII inhibitors: a 50-year perspective. *Haemophilia.* novembro de 2011;17(6):831–8.
7. Coppola A, Favaloro EJ, Tufano A, Di Minno MND, Cerbone AM, Franchini M. Acquired inhibitors of coagulation factors: part I-acquired hemophilia A. *Semin Thromb Hemost.* julho de 2012;38(5):433–46.
8. Tiede A, Collins P, Knoebl P, Teitel J, Kessler C, Shima M, et al. International recommendations on the diagnosis hemophilia and a treatment of acquired. *Haematologica.* 2020;105(7):1791–801.
9. Bonnefoy A, Merlen C, Dubé E, Claus-Desbonnet H, Rivard GE, St-Louis J. Predictive significance of anti-FVIII immunoglobulin patterns on bleeding phenotype and outcomes in acquired hemophilia A: Results from the Quebec Reference Center for Inhibitors. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 1º de dezembro de 2021;19(12):2947–56.

10. Mizrahi T, Doyon K, Dubé E, Bonnefoy A, Warner M, Cloutier S, et al. Relapse pattern and long-term outcomes in subjects with acquired haemophilia A. *Haemophilia*. 1º de março de 2019;25(2):252–7.
11. Collins PW, Hirsch S, Baglin TP, Dolan G, Hanley J, Makris M, et al. Acquired hemophilia A in the United Kingdom: a 2-year national surveillance study by the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation. *Blood*. 1º de março de 2007;109(5):1870–7.
12. Janbain M, Leissinger CA, Kruse-Jarres R. Acquired hemophilia A: emerging treatment options. *J Blood Med*. 2015;6:143–50.
13. Tiede A, Klamroth R, Scharf RE, Trappe RU, Holstein K, Huth-K " A, et al. Prognostic factors for remission of and survival in acquired hemophilia A (AHA): results from the GTH-AH 01/2010 study. *Blood* [Internet]. 2015;125(7):1091–7. Disponível em: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/125/7/1091/1388352/1091.pdf>
14. Schep SJ, Schutgens REG, Fischer K, Boes ML. Review of immune tolerance induction in hemophilia A. Vol. 32, *Blood Reviews*. Churchill Livingstone; 2018. p. 326–38.
15. Berntorp E, Fischer K, Hart DP, Mancuso ME, Stephensen D, Shapiro AD, et al. *Haemophilia*. *Nat Rev Dis Primers*. 24 de junho de 2021;7(1):45.
16. Franchini M, Lippi G. Recombinant Factor VIII Concentrates. *Semin Thromb Hemost*. 14 de julho de 2010;36(05):493–7.
17. Whelan SFJ, Hofbauer CJ, Horling FM, Allacher P, Wolfsegger MJ, Oldenburg J, et al. Distinct characteristics of antibody responses against factor VIII in healthy individuals and in different cohorts of hemophilia A patients. *Blood*. 7 de fevereiro de 2013;121(6):1039–48.
18. Karnell JL, Ettinger R. The interplay of IL-21 and BAFF in the formation and maintenance of human B cell memory. Vol. 3, *Frontiers in Immunology*. 2012.
19. Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW, et al. *WFH Guidelines for the Management of Hemophilia*, 3rd edition. *Haemophilia*. 3 de agosto de 2020;26(S6):1–158.
20. Kruse-Jarres R, Kempton CL, Baudo F, Collins PW, Knoebl P, Leissinger CA, et al. Acquired hemophilia A: Updated review of evidence and treatment guidance. *Am J Hematol*. julho de 2017;92(7):695–705.

21. Franchini M, Mannucci PM. Acquired haemophilia A: a 2013 update. *Thromb Haemost.* dezembro de 2013;110(6):1114–20.
22. Holstein K, Liu X, Smith A, Knöbl P, Klamroth R, Geisen U, et al. Bleeding and response to hemostatic therapy in acquired hemophilia A: Results from the GTH-AH 01/2010 study. *Blood.* 16 de julho de 2020;136(3):279–87.
23. de Lima Montalvão SA, Tucunduva AC, de Almeida Sambo AL, De Paula EV, de Souza Medina S, Ozelo MC. Heat treatment of samples improve the performance of the Nijmegen-Bethesda assay in hemophilia A patients undergoing immune tolerance induction. *Thromb Res.* dezembro de 2015;136(6):1280–4.
24. Tiede A, Werwitzke S, Scharf R. Laboratory Diagnosis of Acquired Hemophilia A: Limitations, Consequences, and Challenges. *Semin Thromb Hemost.* 9 de outubro de 2014;40(07):803–11.
25. Verbruggen B, van Heerde WL, Laros-van Gorkom BAP. Improvements in factor VIII inhibitor detection: From Bethesda to Nijmegen. *Semin Thromb Hemost.* novembro de 2009;35(8):752–9.
26. Collins P, Baudo F, Knoebl P, Lévesque H, Nemes L, Pellegrini F, et al. Immunosuppression for acquired hemophilia A: Results from the European Acquired Haemophilia Registry (EACH2). *Blood.* 5 de julho de 2012;120(1):47–55.
27. Knoebl P, Thaler J, Jilma P, Quehenberger P, Gleixner K, Sperr WR. Efficacy of emicizumab for the treatment of acquired hemophilia A. *Blood.* 21 de janeiro de 2021;137(3):410–9.
28. Jurlander B. Recombinant Activated Factor VII (rFVIIa): Characterization, Manufacturing, and Clinical Development. *Semin Thromb Hemost.* 2001;27(4):373.
29. Shapiro AD, Mitchell IS, Nasr S. The future of bypassing agents for hemophilia with inhibitors in the era of novel agents. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* dezembro de 2018;16(12):2362–74.
30. Kruse-Jarres R, St-Louis J, Greist A, Shapiro A, Smith H, Chowdary P, et al. Efficacy and safety of OBI-1, an antihaemophilic factor VIII (recombinant), porcine sequence, in subjects with acquired haemophilia A. *Haemophilia.* março de 2015;21(2):162–70.

31. Tiede A, Kemkes-Matthes B, Knöbl P. Should emicizumab be used in patients with acquired hemophilia A? *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. março de 2021;19(3):637–44.
32. Thomas VM, Abou-Ismaïl MY, Lim MY. Off-label use of emicizumab in persons with acquired haemophilia A and von Willebrand disease: A scoping review of the literature. *Haemophilia*. 25 de janeiro de 2022;28(1):4–17.
33. Pasca S, Zanon E, Mannucci PM, Peyvandi F. Emicizumab in acquired hemophilia A: pros and cons of a new approach to the prevention and treatment of bleeding. *Blood Transfus*. 7 de fevereiro de 2023;
34. Collins P, Baudo F, Knoebl P, Lévesque H, Nemes L, Pellegrini F, et al. Immunosuppression for acquired hemophilia A: Results from the European Acquired Haemophilia Registry (EACH2). *Blood*. 5 de julho de 2012;120(1):47–55.
35. Knöbl P. Prevention and Management of Bleeding Episodes in Patients with Acquired Hemophilia A. *Drugs*. 12 de dezembro de 2018;78(18):1861–72.
36. Cain DW, Cidlowski JA. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol*. 13 de abril de 2017;17(4):233–47.
37. Iqbal A, Iqbal MK, Sharma S, Ansari MohdA, Najmi AK, Ali SM, et al. Molecular mechanism involved in cyclophosphamide-induced cardiotoxicity: Old drug with a new vision. *Life Sci*. fevereiro de 2019;218:112–31.
38. Emadi A, Jones RJ, Brodsky RA. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat Rev Clin Oncol*. 29 de novembro de 2009;6(11):638–47.
39. Ahlmann M, Hempel G. The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*. 19 de outubro de 2016;78(4):661–71.
40. Madondo MT, Quinn M, Plebanski M. Low dose cyclophosphamide: Mechanisms of T cell modulation. *Cancer Treat Rev*. janeiro de 2016;42:3–9.
41. Kerstin Karcher DB, Antoniou AV, Turk JL, Tan BTG, Scheper RJ. Changes in lymphocyte subsets after treatment with cyclophosphamide and during the development of contact sensitivity in the guinea pig. *Int J Immunopharmacol*. janeiro de 1987;9(2):175–83.

42. Quan X ying, Chen H tao, Liang S qin, Yang C, Yao C wei, Xu Y zhi, et al. Revisited Cyclophosphamide in the Treatment of Lupus Nephritis. *Biomed Res Int.* 26 de maio de 2022;2022:1–9.
43. Jalowiec KA, Andres M, Taleghani BM, Musa A, Dickenmann M, Angelillo-Scherrer A, et al. Acquired hemophilia A and plasma cell neoplasms: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep.* 30 de dezembro de 2020;14(1):206.
44. Brás G, Pinto R, Carvalho M, Fernandes S, Andrade J, Guimarães J. Bortezomib: Potential Key Role in the Treatment of Multiple Myeloma-Related Acquired Hemophilia A. *Semin Thromb Hemost.* 19 de dezembro de 2016;43(01):109–12.
45. Sun L, Su Y, Jiao A, Wang X, Zhang B. T cells in health and disease. *Signal Transduct Target Ther.* 19 de junho de 2023;8(1):235.
46. Maouia A, Rebetz J, Kapur R, Semple JW. The Immune Nature of Platelets Revisited. *Transfus Med Rev.* outubro de 2020;34(4):209–20.
47. Hillion S, Arleevskaya MI, Blanco P, Bordron A, Brooks WH, Cesbron JY, et al. The Innate Part of the Adaptive Immune System. *Clin Rev Allergy Immunol.* 1º de abril de 2020;58(2):151–4.
48. Wibroe PP, Helvig SY, Moein Moghimi S. The Role of Complement in Antibody Therapy for Infectious Diseases. *Microbiol Spectr.* 14 de março de 2014;2(2).
49. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *The Lancet.* 2 de junho de 2001;357:1777–89.
50. Chapman NM, Boothby MR, Chi H. Metabolic coordination of T cell quiescence and activation. *Nat Rev Immunol.* 12 de janeiro de 2020;20(1):55–70.
51. Huang H, Long L, Zhou P, Chapman NM, Chi H. mTOR signaling at the crossroads of environmental signals and T-cell fate decisions. *Immunol Rev.* 25 de maio de 2020;295(1):15–38.
52. Fang D, Zhu J. Dynamic balance between master transcription factors determines the fates and functions of CD4 T cell and innate lymphoid cell subsets. *Journal of Experimental Medicine.* 3 de julho de 2017;214(7):1861–76.

53. Ruterbusch M, Pruner KB, Shehata L, Pepper M. In Vivo CD4+ T Cell Differentiation and Function: Revisiting the Th1/Th2 Paradigm. *Annu Rev Immunol.* 26 de abril de 2020;38:705–25.
54. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: Fates, functions, and faults. *Blood.* 2008;112(5):1557–69.
55. Ono M. Control of regulatory T-cell differentiation and function by T-cell receptor signalling and Foxp3 transcription factor complexes. *Immunology.* 9 de maio de 2020;160(1):24–37.
56. King C, Tangye SG, Mackay CR. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:741–66.
57. Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, et al. Bcl6 and Blimp-1 Are Reciprocal and Antagonistic Regulators of T Follicular Helper Cell Differentiation. *Science (1979).* 21 de agosto de 2009;325(5943):1006–10.
58. Raphael I, Joern RR, Forsthuber TG. Memory CD4+ T Cells in Immunity and Autoimmune Diseases. *Cells.* 25 de fevereiro de 2020;9(3):531.
59. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol.* 27 de março de 2015;15(3):160–71.
60. Cenerenti M, Saillard M, Romero P, Jandus C. The Era of Cytotoxic CD4 T Cells. *Front Immunol.* 27 de abril de 2022;13.
61. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 cells. Vol. 27, *Annual Review of Immunology.* 2009. p. 485–517.
62. Reding MT. Immunological aspects of inhibitor development. *Haemophilia.* dezembro de 2006;12(s6):30–6.
63. Crotty S. Follicular Helper CD4 T Cells (Tfh). *Annu Rev Immunol.* 23 de abril de 2011;29(1):621–63.
64. Patel DD, Lee DM, Kolbinger F, Antoni C. Effect of IL-17A blockade with secukinumab in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis.* abril de 2013;72(suppl 2):iii116–23.
65. Tsubata T. B-cell tolerance and autoimmunity. Vol. 6, *F1000Research.* Faculty of 1000 Ltd; 2017.

66. Cancro MP. Age-Associated B Cells. *Annu Rev Immunol* [Internet]. abril de 2020;26:315–40. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-092419->
67. Seiringer P, Garzorz-Stark N, Eyerich K. T-Cell–Mediated Autoimmunity: Mechanisms and Future Directions. *J Invest Dermatol*. março de 2022;142(3 Pt B):804–10.
68. Mackay IR, Leskovsek N V, Rose NR. Cell damage and autoimmunity: a critical appraisal. *J Autoimmun*. 2008;30(1–2):5–11.
69. Kucuksezer UC, Ozdemir C, Akdis M, Akdis CA. Influence of Innate Immunity on Immune Tolerance. *Acta Med Acad*. 11 de novembro de 2020;49(2):164.
70. Schietinger A, Greenberg PD. Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol*. fevereiro de 2014;35(2):51–60.
71. Hosseini A, Gharibi T, Marofi F, Babaloo Z, Baradaran B. CTLA-4: From mechanism to autoimmune therapy. *Int Immunopharmacol*. março de 2020;80:106221.
72. Rui L, Healy JI, Blasioli J, Goodnow CC. ERK signaling is a molecular switch integrating opposing inputs from B cell receptor and T cell cytokines to control TLR4-driven plasma cell differentiation. *J Immunol*. 15 de outubro de 2006;177(8):5337–46.
73. Khan U, Ghazanfar H. T Lymphocytes and Autoimmunity. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2018;341:125–68.
74. Nemazee D. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(5):281–94.
75. Liu Z, Davidson A. BAFF and selection of autoreactive B cells. *Trends Immunol*. agosto de 2011;32(8):388–94.
76. Tanaka S, Baba Y. B Cell Receptor Signaling. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1254:23–36.
77. Pratt KP, Thompson AR. B-cell and T-cell epitopes in anti-factor VIII immune responses. Vol. 37, *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. 2009. p. 80–95.
78. Mauri C. Regulation of immunity and autoimmunity by B cells. *Curr Opin Immunol*. dezembro de 2010;22(6):761–7.

79. André S, Meslier Y, Dimitrov JD, Repessé Y, Kaveri S V., Lacroix-Desmazes S, et al. A Cellular Viewpoint of Anti-FVIII Immune Response in Hemophilia A. *Clin Rev Allergy Immunol*. 23 de outubro de 2009;37(2):105–13.
80. Abdolmaleki F, Farahani N, Gheibi Hayat SM, Pirro M, Bianconi V, Barreto GE, et al. The Role of Efferocytosis in Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 20 de julho de 2018;9.
81. Jin W, Luo Z, Yang H. Peripheral B Cell Subsets in Autoimmune Diseases: Clinical Implications and Effects of B Cell-Targeted Therapies. *J Immunol Res*. 2020;2020:9518137.
82. Deane JA, Pisitkun P, Barrett RS, Feigenbaum L, Town T, Ward JM, et al. Control of toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation. *Immunity*. novembro de 2007;27(5):801–10.
83. Groom JR, Fletcher CA, Walters SN, Grey ST, Watt S V., Sweet MJ, et al. BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 6 de agosto de 2007;204(8):1959–71.
84. Zhang H, Weyand CM, Goronzy JJ. Hallmarks of the aging T-cell system. *FEBS J*. 3 de dezembro de 2021;288(24):7123–42.
85. Baudo F, Collins P, Huth-Kühne A, Lévesque H, Marco P, Nemes L, et al. Management of bleeding in acquired hemophilia A: results from the European Acquired Haemophilia (EACH2) Registry. *Blood*. 5 de julho de 2012;120(1):39–46.
86. Goronzy JJ, Weyand CM. Immune aging and autoimmunity. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1º de maio de 2012;69(10):1615–23.
87. Manni M, Gupta S, Ricker E, Chinenov Y, Park SH, Shi M, et al. Regulation of age-associated B cells by IRF5 in systemic autoimmunity. *Nat Immunol*. 26 de abril de 2018;19(4):407–19.
88. Du SW, Arkatkar T, Jacobs HM, Rawlings DJ, Jackson SW. Generation of functional murine CD11c⁺ age-associated B cells in the absence of B cell T-bet expression. *Eur J Immunol*. 5 de janeiro de 2019;49(1):170–8.
89. Naradikian MS, Myles A, Beiting DP, Roberts KJ, Dawson L, Herati RS, et al. Cutting Edge: IL-4, IL-21, and IFN- γ Interact To Govern T-bet and CD11c Expression in TLR-Activated B Cells. *The Journal of Immunology*. 15 de agosto de 2016;197(4):1023–8.

90. Li Z yu, Cai ML, Qin Y, Chen Z. Age/autoimmunity-associated B cells in inflammatory arthritis: An emerging therapeutic target. *Front Immunol.* 24 de janeiro de 2023;14.
91. Knode LMR, Naradikian MS, Myles A, Scholz JL, Hao Y, Liu D, et al. Age-Associated B Cells Express a Diverse Repertoire of VH and Vk Genes with Somatic Hypermutation. *The Journal of Immunology.* 1º de março de 2017;198(5):1921–7.
92. Rubtsova K, Rubtsov A V., van Dyk LF, Kappler JW, Marrack P. T-box transcription factor T-bet, a key player in a unique type of B-cell activation essential for effective viral clearance. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 20 de agosto de 2013;110(34).
93. Phalke S, Rivera-Correa J, Jenkins D, Flores Castro D, Giannopoulou E, Pernis AB. Molecular mechanisms controlling age-associated B cells in autoimmunity*. *Immunol Rev.* 31 de maio de 2022;307(1):79–100.
94. Kruse-Jarres R, Fang J, Leissing CA, Ganapamo F. Rituximab therapy modulates IFN- γ and IL-4 gene expression in a patient with acquired haemophilia A: Correspondence. Vol. 148, *British Journal of Haematology.* 2010. p. 176–8.
95. Lollar P, Healey JF, Barrow RT, Parker ET. Factor VIII inhibitors. Em: *Advances in experimental medicine and biology.* Boston, MA: Springer; 2001. p. 65–73.
96. Bannow BS, Recht M, Négrier C, Hermans C, Berntorp E, Eichler H, et al. Factor VIII: Long-established role in haemophilia A and emerging evidence beyond haemostasis. *Blood Rev.* maio de 2019;35:43–50.
97. Prescott R, Nakai H, Saenko EL, Scharrer I, Nilsson IM, Humphries JE, et al. 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.* 15 de maio de 1997;89(10):3663–71.
98. Kiouptsi K, Reinhardt C. Physiological Roles of the von Willebrand Factor-Factor VIII Interaction. Em: Hoeger U, Harris JR, organizadores. *Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins.* Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 438–50.

99. Oldenburg J, Zeitler H, Pavlova A. Genetic markers in acquired haemophilia. *Haemophilia*. maio de 2010;16 Suppl 3:41–5.
100. Saint-Remy JMR, Lacroix-Desmazes S, Oldenburg J. Inhibitors in haemophilia: pathophysiology. *Haemophilia*. outubro de 2004;10(s4):146–51.
101. Wootla B, Dasgupta S, Dimitrov JD, Bayry J, Lévesque H, Borg JY, et al. Factor VIII Hydrolysis Mediated by Anti-Factor VIII Autoantibodies in Acquired Hemophilia. *The Journal of Immunology*. 2008;180(11):7714–20.
102. Lai JD, Lillicrap D. Factor VIII inhibitors: Advances in basic and translational science. *Int J Lab Hematol*. maio de 2017;39 Suppl 1:6–13.
103. McGuire HM, Vogelzang A, Warren J, Loetsch C, Natividad KD, Chan TD, et al. IL-21 and IL-4 Collaborate To Shape T-Dependent Antibody Responses. *J Immunol*. 1º de dezembro de 2015;195(11):5123–35.
104. Tiede A, Hofbauer CJ, Werwitzke S, Knöbl P, Knöbl K, Gottstein S, et al. Anti-factor VIII IgA as a potential marker of poor prognosis in acquired hemophilia A: results from the GTH-AH 01/2010 study. *Blood* [Internet]. 2016;127:2289–97. Disponível em: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/127/19/2289/1393138/2289.pdf>
105. Zou KH, Tuncali K, Silverman SG. Correlation and simple linear regression. Vol. 227, *Radiology*. 2003. p. 617–22.
106. Yang J, Sundrud MS, Skepner J, Yamagata T. Targeting Th17 cells in autoimmune diseases. Vol. 35, *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd; 2014. p. 493–500.
107. Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A, et al. Induction and molecular signature of pathogenic T H 17 cells. *Nat Immunol*. outubro de 2012;13(10):991–9.
108. Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Nakashima T, Oh-Hora M, Kodama T, et al. Pathogenic conversion of Foxp3 + T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med*. 2014;20(1):62–8.
109. Muranski P, Restifo NP. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood*. 2013;121(13):2402–14.
110. Eliçabe RJ, Silva JE, Dave MN, Lacoste MG, Tamashiro H, Blas R, et al. Association between IL-17 and IgA in the joints of patients with inflammatory arthropathies. *BMC Immunol*. 6 de fevereiro de 2017;18(1):8.

111. Lu KT, Kanno Y, Cannons JL, Handon R, Bible P, Elkahloun AG, et al. Functional and Epigenetic Studies Reveal Multistep Differentiation and Plasticity of In Vitro-Generated and In Vivo-Derived Follicular T Helper Cells. *Immunity*. 28 de outubro de 2011;35(4):622–32.
112. Kurata I, Matsumoto I, Sumida T. T follicular helper cell subsets: a potential key player in autoimmunity. Vol. 44, *Immunological Medicine*. Taylor and Francis Ltd.; 2021. p. 1–9.
113. Bélanger S, Crotty S. Dances with cytokines, featuring TFH cells, IL-21, IL-4 and B cells. Vol. 17, *Nature Immunology*. Nature Publishing Group; 2016. p. 1135–6.
114. Jing W, Chen J, Cai Y, Chen Y, Schroeder JA, Johnson BD, et al. Induction of activated T follicular helper cells is critical for anti-FVIII inhibitor development in hemophilia A mice. *Blood Adv*. 2019;3(20):3099–110.
115. Avery DT, Bryant VL, Ma CS, de Waal Malefyt R, Tangye SG. IL-21-Induced Isotype Switching to IgG and IgA by Human Naive B Cells Is Differentially Regulated by IL-4. *The Journal of Immunology*. 1º de agosto de 2008;181(3):1767–79.
116. Doshi BS, Raffini LJ, George LA. Combined anti-CD20 and mTOR inhibition with factor VIII for immune tolerance induction in hemophilia A patients with refractory inhibitors. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. abril de 2020;18(4):848–52.
117. Desjardins M, Béland M, Dembele M, Lejtenyi D, Drolet JP, Lemire M, et al. Modulation of the Interleukin-21 Pathway with Interleukin-4 Distinguishes Common Variable Immunodeficiency Patients with More Non-infectious Clinical Complications. *J Clin Immunol*. janeiro de 2018;38(1):45–55.
118. Vijayanand P, Seumois G, Simpson LJ, Abdul-Wajid S, Baumjohann D, Panduro M, et al. Interleukin-4 production by follicular helper T cells requires the conserved IL4 enhancer hypersensitivity site V. *Immunity*. 24 de fevereiro de 2012;36(2):175–87.
119. Harada Y, Tanaka S, Motomura Y, Harada Y, Ohno S ichiro, Ohno S, et al. The 3' enhancer CNS2 is a critical regulator of interleukin-4-mediated humoral immunity in follicular helper T cells. *Immunity*. 24 de fevereiro de 2012;36(2):188–200.

120. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*. julho de 2015;74(1):5–17.
121. Kokic V, Martinovic Kaliterna D, Radic M, Perkovic D, Cvek M, Capkun V. Relationship between vitamin D, IFN- γ , and E2 levels in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 24 de março de 2016;25(3):282–8.
122. Domeier PP, Chodisetti SB, Soni C, Schell SL, Elias MJ, Wong EB, et al. IFN- γ receptor and STAT1 signaling in B cells are central to spontaneous germinal center formation and autoimmunity. *J Exp Med*. 2 de maio de 2016;213(5):715–32.
123. Kruse-Jarres R, Fang J, Leissinger CA, Ganapamo F. Reduced production of IFN- γ and LT- α is associated with successful prednisone therapy in patients with acquired hemophilia A: A pilot study. *Thromb Res*. novembro de 2011;128(5).
124. Holbrook J, Lara-Reyna S, Jarosz-Griffiths H, McDermott M. Tumour necrosis factor signalling in health and disease [version 1; referees: 2 approved]. Vol. 8, F1000Research. F1000 Research Ltd; 2019.
125. Croft M, Siegel RM. Beyond TNF: TNF superfamily cytokines as targets for the treatment of rheumatic diseases. Vol. 13, *Nature Reviews Rheumatology*. Nature Publishing Group; 2017. p. 217–33.
126. Vincent FB, Morand EF, Schneider P, MacKay F. The BAFF/APRIL system in SLE pathogenesis. Vol. 10, *Nature Reviews Rheumatology*. Nature Publishing Group; 2014. p. 365–73.
127. Rawlings DJ, Metzler G, Wray-Dutra M, Jackson SW. Altered B cell signalling in autoimmunity. Vol. 17, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2017. p. 421–36.
128. Lempicki MD, Paul S, Serbulea V, Upchurch CM, Sahu S, Gray JA, et al. BAFF antagonism via the BAFF receptor 3 binding site attenuates BAFF 60-mer-induced classical NF- κ B signaling and metabolic reprogramming of B cells. *Cell Immunol*. novembro de 2022;381:104603.
129. Fairfax KA, Tsantikos E, Figgett WA, Vincent FB, Quah PS, LePage M, et al. BAFF-driven autoimmunity requires CD19 expression. *J Autoimmun*. agosto de 2015;62:1–10.

130. Jacque E, Schweighoffer E, Tybulewicz VLJ, Ley SC. BAFF activation of the ERK5 MAP kinase pathway regulates B cell survival. *Journal of Experimental Medicine*. 1º de junho de 2015;212(6):883–92.
131. Devauchelle-Pensec V, Mariette X, Jousse-Joulin S, Berthelot JM, Perdriger A, Puéchal X, et al. Treatment of Primary Sjögren Syndrome With Rituximab. *Ann Intern Med*. 18 de fevereiro de 2014;160(4):233–42.
132. Zhang X, Olsen N, Zheng SG. The progress and prospect of regulatory T cells in autoimmune diseases. *J Autoimmun*. 2020;111(April).
133. Kappos L, Hartung HP, Freedman MS, Boyko A, Radü EW, Mikol DD, et al. Atacicept in multiple sclerosis (ATAMS): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. *Lancet Neurol*. abril de 2014;13(4):353–63.
134. Buchanan R, Popowych Y, Dagenais C, Arsic N, Mutwiri GK, Potter AA, et al. Interferon-gamma and B-cell Activating Factor (BAFF) promote bovine B cell activation independent of TLR9 and T-cell signaling. *Vet Immunol Immunopathol*. 15 de janeiro de 2012;145(1–2):453–63.
135. Scapini P, Hu Y, Chu CL, Migone TS, DeFranco AL, Cassatella MA, et al. Myeloid cells, BAFF, and IFN- γ establish an inflammatory loop that exacerbates autoimmunity in Lyn-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine*. 2 de agosto de 2010;207(8):1757–73.
136. Gui L, Zeng Q, Xu Z, Zhang H, Qin S, Liu C, et al. IL-2, IL-4, IFN- γ or TNF- α enhances BAFF-stimulated cell viability and survival by activating Erk1/2 and S6K1 pathways in neoplastic B-lymphoid cells. *Cytokine*. 1º de agosto de 2016;84:37–46.
137. Kahle J, Orłowski A, Stichel D, Healey JF, Parker ET, Jacquemin M, et al. Frequency and epitope specificity of anti-factor VIII C1 domain antibodies in acquired and congenital hemophilia A. *Blood*. 10 de agosto de 2017;130(6):808–16.
138. Doshi BS, Rana J, Castaman G, Shaheen MA, Kaczmarek R, Butterfield JS, et al. B cell-activating factor modulates the factor VIII immune response in hemophilia A. *J Clin Invest*. 15 de abril de 2021;131(8).
139. Hodeib H, El Amrousy D, Youssef A, Elaskary E, Fouda MH. BAFF rs9514828 gene polymorphism and the risk of the development of inhibitors in children with severe haemophilia A. *Haemophilia*. maio de 2022;28(3):472–9.

140. Levy RA, Gonzalez-Rivera T, Khamashta M, Fox NL, Jones-Leone A, Rubin B, et al. 10 Years of belimumab experience: What have we learnt? *Lupus*. 8 de outubro de 2021;30(11):1705–21.
141. Sakurai Y, Takeda T. Acquired Hemophilia A: A Frequently Overlooked Autoimmune Hemorrhagic Disorder. *J Immunol Res*. 2014;2014:1–10.

ANEXO 1 – Aspectos (Comprovante de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP)



Continuação do Parecer: 5.242.367

- Carolina Costa-Lima
- Gabriela Goes Yamaguti Hayakawa
- Jessica Oliveira Frade Guanaes
- Margareth Castro Ozelo
- Marina Pereira Colella
- Nivia Maria Foschi
- Samuel de Souza Medina
- Silmara Aparecida de Lima Montalvão
- Vanessa Boury Faiotto

Conforme assinalado na documentação que segue junto com a Emenda (arquivo 'Carta_encaminhamento_respostas_pendencias_11Fev2022.pdf', de 11/02/2022 16:59:18), a pesquisadora 'Bárbara da Silva Ferraz' foi excluída da equipe de pesquisa original.

E, conforme assinalado na documentação que segue junto com a Emenda (arquivo 'Carta_encaminhamento_respostas_pendencias_11Fev2022.pdf', de 11/02/2022 16:59:18), a etapa denominada 'Avaliação conjunta dos dados obtidos, repetição de análises. Redação dos artigos científicos. Defesa de tese' teve sua data alterada para o período compreendido entre '01/03/2022' e '30/11/2022'.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Para avaliação desta Emenda foi analisado o documento intitulado 'PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1833227_E1.pdf', de 11/02/2022 17:00:54

Recomendações:

A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep), do Conselho Nacional de Saúde (CNS) orienta a adoção das diretrizes do Ministério da Saúde (MS) decorrentes da pandemia causada pelo Coronavírus SARS-CoV-2 (Covid-19), com o objetivo de minimizar os potenciais riscos à saúde e a integridade dos participantes de pesquisas e pesquisadores.

De acordo com carta circular da CONEP intitulada "ORIENTAÇÕES PARA CONDUÇÃO DE PESQUISAS E ATIVIDADE DOS CEP DURANTE A PANDEMIA PROVOCADA PELO CORONAVÍRUS SARS-COV-2 (COVID-19)" publicada em 09/05/2020, referente ao item II. "Orientações para Pesquisadores":

- Aconselha-se a adoção de medidas para a prevenção e gerenciamento de todas as atividades de pesquisa, garantindo-se as ações primordiais à saúde, minimizando prejuízos e potenciais riscos, além de prover cuidado e preservar a integridade e assistência dos participantes e da equipe de

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 1º andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@unicamp.br



Continuação do Parecer: 5.242.367

pesquisa.

- Em observância às dificuldades operacionais decorrentes de todas as medidas impostas pela pandemia do SARS-CoV-2 (COVID-19), é necessário zelar pelo melhor interesse do participante da pesquisa, mantendo-o informado sobre as modificações do protocolo de pesquisa que possam afetá-lo, principalmente se houver ajuste na condução do estudo, cronograma ou plano de trabalho.
- Caso sejam necessários a suspensão, interrupção ou o cancelamento da pesquisa, em decorrência dos riscos imprevisíveis aos participantes da pesquisa, por causas diretas ou indiretas, caberá aos investigadores a submissão de notificação para apreciação do Sistema CEP/Conep.
- Nos casos de ensaios clínicos, é permitida, excepcionalmente, a tramitação de emendas concomitantes à implementação de modificações/alterações no protocolo de pesquisa, visando à segurança do participante da pesquisa, assim como dos demais envolvidos no contexto da pesquisa, evitando-se, ainda, quando aplicável, a interrupção no tratamento dos participantes da pesquisa. Eventualmente, na necessidade de modificar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o pesquisador deverá proceder com o novo consentimento, o mais breve possível.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda Aprovada

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 1º andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@unicamp.br



Continuação do Parecer: 5.242.367

previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.

- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1833227_E1.pdf	11/02/2022 17:00:54		Aceito
Outros	Carta_encaminhamento_respostas_pendencias_11Fev2022.pdf	11/02/2022 16:59:18	Vanessa Boury Faiotto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	Projeto_HemofiliaA_adquirida_Fev2022.docx	11/02/2022 16:58:18	Vanessa Boury Faiotto	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 1º andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@unicamp.br



Continuação do Parecer: 5.242.367

Investigador	Projeto_HemofiliaA_adquirida_Fev2022.docx	11/02/2022 16:58:18	Vanessa Boury Faiotto	Aceito
Outros	Carta_encaminhamento_emenda1_02Fev2022.pdf	02/02/2022 15:31:12	Margareth Castro Ozelo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Hemofilia_A_Adquirida_Doutorado_V3_fevereiro2022.pdf	02/02/2022 15:16:34	Margareth Castro Ozelo	Aceito
Outros	POP_Lab_Ozelo_Biorrepositorio_2016_Hemofilia_A_adquirida.pdf	20/05/2016 14:21:19	Margareth Castro Ozelo	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	16/05/2016 15:17:10	Ana Paula Racanelli	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 14 de Fevereiro de 2022

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 1º andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@unicamp.br