

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE BIOMEDICINA

CLÉVIA ROSSET

**POLIMORFISMOS EM GENES ENVOLVIDOS NA
REGULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE E O RISCO DE
DESENVOLVIMENTO DE INIBIDORES EM HEMOFÍLICOS A
GRAVES**

Porto Alegre, julho de 2010.

CLÉVIA ROSSET

POLIMORFISMOS EM GENES ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO
DO SISTEMA IMUNE E O RISCO DE DESENVOLVIMENTO DE
INIBIDORES EM HEMOFÍLICOS A GRAVES

Trabalho Experimental do Estágio em Pesquisa e Monografia
Laboratório de Hemostasia – Departamento de Genética
Instituto de Biociências

Profa. Dra. Eliane Bandinelli
Orientadora

Porto Alegre, julho de 2010.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por me proporcionarem essa oportunidade e pelo apoio e incentivo sem os quais eu não chegaria até aqui.

A Dra. Eliane Bandinelli, pelos seus ensinamentos, amizade e paciência que dedicou a mim.

Às colegas e ex-colegas do Laboratório de Hemostasia: Ana Maria, Carla, Celina, Daiane, Fernanda, Luciana, Mariana, Roberta, Simone e Taciane, pela amizade, auxílio fundamental e convívio agradável.

Aos meus colegas e amigos do curso de Biomedicina, pelo companheirismo e apoio sempre que precisei.

A todos os meus amigos que de alguma forma contribuíram com ensinamentos pessoais ou profissionais e pelos momentos importantes que passamos juntos.

Aos professores do curso de Biomedicina da UFRGS, por contribuírem para a minha formação profissional.

ÍNDICE GERAL

RESUMO	4
1. INTRODUÇÃO	6
1.1. HEMOSTASIA	6
1.1.1. Mecanismo de Coagulação Sanguínea	7
1.1.2. Fator VIII	11
1.2. HEMOFILIA A	13
1.2.1. Mutações no Gene do FVIII e a Hemofilia A	14
1.2.2. Desenvolvimento de Inibidores Contra o FVIII	15
1.2.2.1. Mecanismo de Formação dos Inibidores	16
1.2.2.2. Fatores de Risco para Formação de Inibidores	20
1.2.2.3. Tratamento de Pacientes com Inibidor	25
1.3. POLIMORFISMOS NO GENE DO HLA-G E A FORMAÇÃO DE INIBIDORES	26
1.4. POLIMORFISMOS NO GENE PTPN22 E A FORMAÇÃO DE INIBIDORES	31
2. OBJETIVOS	33
2.1. OBJETIVO GERAL	33
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3. ARTIGO	35
Resumo	36
Introdução	36
Materiais e métodos	38
Resultados	40
Discussão e conclusão	43
Referências	47
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	51
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

RESUMO

A hemofilia A é uma das doenças hemorrágicas mais frequentes da via intrínseca da cascata de coagulação sanguínea. Ela é causada pela redução da atividade do fator VIII da coagulação, devido a alterações no gene desse fator. O tratamento envolve terapia de reposição do fator VIII, que é efetiva na maioria dos casos. Entretanto, uma das principais complicações que ocorre no tratamento desses pacientes é a formação de anticorpos (inibidores) que inibem a atividade coagulante do fator infundido. Tanto fatores genéticos quanto não-genéticos influenciam a suscetibilidade no desenvolvimento de inibidores. Em particular, o tipo de mutação no gene do fator VIII parece contribuir consideravelmente para o risco, sendo as inversões dos introns 1 e 22 em pacientes graves as mais associadas com o quadro. O genótipo HLA e de outros genes que regulam o sistema imune também tem papel importante no desenvolvimento dos anticorpos. O objetivo deste estudo é avaliar se polimorfismos em genes envolvidos na regulação do sistema imune podem conferir suscetibilidade ao desenvolvimento de inibidores no tratamento de pacientes com hemofilia A grave do sul do Brasil. Foi avaliada a distribuição dos polimorfismos de inserção/deleção de 14pb (rs1704) e do SNP +3142C/G (rs1063320) no gene HLA-G e do SNP C1858T (rs2476601) no gene PTPN22, que têm sido amplamente relacionados com doenças autoimunes e outras patologias. Moléculas de HLA-G solúvel funcionam como múltiplos imunorreguladores, e a tirosina fosfatase codificada por PTPN22 previne a ativação espontânea de células T. Foram estudados 171 pacientes eurodescendentes com hemofilia A grave, previamente genotipados para as inversões nos introns 1 e 22. Os polimorfismos foram genotipados por PCR (Ins/Del 14pb) ou PCR/RFLP (SNPs). Os grupos com inibidor e sem inibidor apresentaram distribuição genotípica consistente com a predita pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, em todos os polimorfismos analisados. As frequências genotípicas e alélicas em pacientes com inibidores não foram significativamente diferentes das observadas no grupo sem inibidores, para os três polimorfismos estudados. Considerando somente os pacientes que possuem as inversões dos introns 1 e 22, nenhum dos polimorfismos influenciou o desenvolvimento de inibidores. Ainda, não houve interação entre as variantes genéticas e a presença de inversões no desenvolvimento de inibidores. Em uma análise multivariada, controlando-se para a presença das inversões, nenhum dos polimorfismos foi considerado fator de risco

para o desenvolvimento de inibidores. Além disso, nenhuma relação foi encontrada entre combinações específicas dos alelos do HLA-G e a produção de anticorpos. Os resultados obtidos sugerem a falta de associação entre os polimorfismos HLA-G $\pm 14\text{pb}$, HLA-G +3142C/G e PTPN22 C1858T e o desenvolvimento de inibidores em nossa população de estudo. Um estudo anterior realizado na Itália com o polimorfismo em PTPN22 apresentou resultados concordantes com os do presente estudo. Outros estudos que envolvam os fatores de risco imunológicos, genéticos e ambientais podem ser interessantes para a melhor compreensão da patogênese da formação de inibidores.

1. INTRODUÇÃO

As doenças hemorrágicas são patologias graves que causam diminuição da coagulação do sangue, com grande comprometimento na qualidade de vida dos pacientes acometidos. O conhecimento dos diversos fatores que mantêm a hemostasia, assim como os responsáveis pelo seu desequilíbrio, tem enorme importância no esclarecimento dos mecanismos que envolvem tais doenças, buscando formas de prevenção, alívio dos sintomas ou tratamentos mais eficientes. Dentre essas desordens hemorrágicas, a doença de von Willebrand e as hemofilias A e B, juntas, afetam cerca de 97% dos indivíduos com alguma deficiência na hemostasia (Peyvandi *et al.*, 2006).

1.1. HEMOSTASIA

O sangue é responsável por diversas funções importantes no organismo, as quais mantêm constantes as condições internas do corpo, para que seu funcionamento seja ideal. Entretanto, para a manutenção de todas as suas funções, o sangue precisa permanecer fluido dentro dos vasos sanguíneos. Assim, se ocorrer um extravasamento de sangue dos vasos ou ele não permanecer líquido, surgem certas modificações que estancam o sangramento ou atuam na fluidez sanguínea. Esse conjunto de mudanças fisiológicas é conhecido como hemostasia (Tuddenham & Cooper, 1994). Se qualquer uma dessas mudanças ocorrerem de maneira desregulada, a hemostasia é comprometida, podendo resultar na perda excessiva de sangue ou na formação de trombos.

O processo de hemostasia envolve um mecanismo complexo, multifuncional, finamente regulado e, sobretudo, vital na defesa contra a perda de sangue e início do reparo tecidual. Dele depende a formação do coágulo (coagulação) e a sua degradação (fibrinólise) (Marcus & Safier, 1993). A hemostasia primária estanca o sangramento pela formação do tampão ou trombo plaquetário; a hemostasia secundária forma uma rede de fibrina (coágulo) encarregada de estabilizar o trombo. O processo hemostático envolve: (1) vasoconstrição no sítio de injúria vascular; (2) formação do tampão de plaquetas (adesão, ativação e agregação plaquetária); (3) a

ativação da cascata de coagulação sanguínea, levando à formação da rede de fibrina; (4) a dissolução da rede de fibrina.

A adesão plaquetária é estimulada pela lesão do endotélio do vaso, que imediatamente expõe o colágeno subendotelial às plaquetas circulantes. Esta ligação é estabilizada pelo fator de von Willebrand (FvW), um multímero produzido normalmente pelas células do endotélio. Depois de aderidas, as plaquetas sofrem ação de substâncias ativadoras, liberam o conteúdo de seus grânulos, o que provoca o recrutamento de outras plaquetas, e ganham a capacidade de se ligar umas às outras (agregação plaquetária), formando um tampão celular. As plaquetas ativadas ainda expõem em sua membrana fosfolipídios essenciais para as reações da formação da rede de fibrina (coagulação), que ocorrem paralelamente à agregação plaquetária. O caráter essencial desse processo de coagulação é que uma proteína circulante, solúvel no plasma, o fibrinogênio, transforma-se em fibrina, o coágulo sólido, que estabiliza o trombo plaquetário (Marcus & Safier, 1993).

1.1.1. Mecanismo de Coagulação Sanguínea

Em 1964, Macfarlane e Davie & Ratnoff propuseram a via clássica para explicar a fisiologia da coagulação do sangue. A proposta compreende as vias intrínseca e extrínseca. Nas duas vias atuam cerca de 20 fatores plasmáticos, quase todos de natureza protéica, sendo a maioria enzimas que circulam em estado não ativado (zimogênios) no sangue, suscetíveis à ativação em cascata pelo fator anterior ativo (Figura 1). O sistema funciona como uma cascata amplificadora: o fator que dá início ao processo está em pequena quantidade, mas é capaz de ativar um número muito maior do próximo fator da cascata, e assim por diante. Vários processos de retroalimentação positivos e negativos regulam a cascata de coagulação (Broze, 1995).

Na via extrínseca, a lesão do vaso provoca a liberação de fator tecidual (TF), também conhecido como tromboplastina, pelas células endoteliais. O TF, por sua vez, liga-se às formas zimogênicas do fator VII presentes no sangue. Essa ligação ativa o fator VII (VIIa), promovendo a formação do complexo tenase extrínseco, que depende do cálcio e consiste da interação entre o TF e o fator VIIa (Tuddenham & Cooper, 1994). O complexo tenase extrínseco catalisa a ativação do fator X.

A via intrínseca, ou via do contato mediada por superfície negativa, é inicializada pelo contato do sangue com superfícies de carga negativa, tal como o

colágeno *in vivo* e o vidro ou partículas de caolin *in vitro*. Nestas superfícies, o cininogênio de alto peso molecular começa a ativar o fator XII. O fator XII ativado (XIIa) ativa o fator XI, e o fator XIa participa da formação do complexo tenase intrínseco, dependente de cálcio e fosfolipídeos de membrana, que ativa o fator IX, o qual por sua vez, na presença do fator VIIIa, ativa o fator X (Tuddenham & Cooper, 1994).

A partir da ativação do fator X, o mecanismo observado na via extrínseca e intrínseca é o mesmo (via comum). O fator Xa ativa o fator V, possibilitando a formação do complexo protrombinase. O complexo protrombinase, que também depende de cálcio, leva à conversão da protrombina (fator II) em trombina (fator IIa). Uma grande quantidade de trombina é formada neste momento, devido ao mecanismo de amplificação da cascata da coagulação. A trombina promove a transformação do fibrinogênio em monômeros de fibrina, que logo se combinam para formar polímeros, além de ativar o fator XIII. O fator XIIIa estabiliza o coágulo. O processo é finalizado com a formação de um aglomerado de plaquetas e células, como eritrócitos, o que consolida o coágulo que sela a lesão e interrompe o extravasamento sanguíneo (Tuddenham & Cooper, 1994; Broze, 1995).

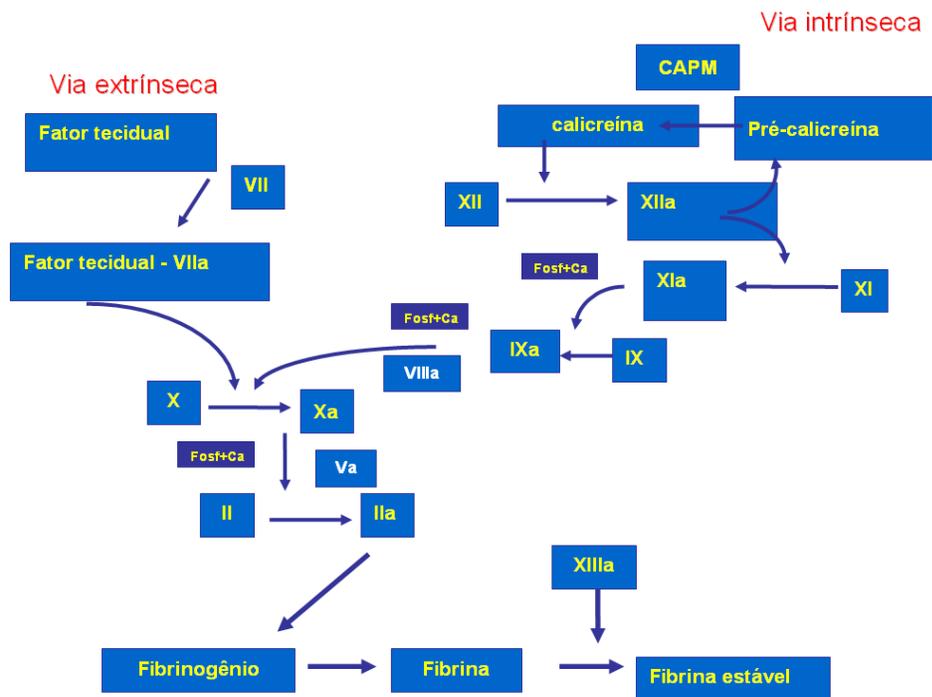


Fig.1. A via clássica da cascata da coagulação sanguínea. Representação da Via Extrínseca e Intrínseca da Coagulação. Adaptado de Tuddenham & Cooper, 1994.

Atualmente, a divisão do sistema de coagulação do sangue em intrínseco e extrínseco é inadequada do ponto de vista de fisiologia da coagulação, tendo em vista que essa divisão não ocorre *in vivo*. A utilização dos termos intrínseco e extrínseco ainda pode ser útil na interpretação dos exames laboratoriais utilizados para avaliação da hemostasia.

Em 2001, foi proposto um novo modelo de coagulação sanguínea que melhor representa o que ocorre *in vivo* durante o reparo de uma lesão endotelial. Nesse modelo, os receptores celulares específicos passam a ter importância no processo de coagulação, diferentemente da visão de que a coagulação é regulada por fatores protéicos, sendo as células apenas uma superfície negativa sobre a qual os complexos pró-coagulantes são montados. O modelo enfoca a interação dos fatores da coagulação com superfícies celulares específicas e se baseia numa série de três etapas (Iniciação, Amplificação e Propagação) que ocorrem em diferentes tipos celulares, até a formação da rede estável de fibrina (Hoffman & Monroe, 2001; Hoffman, 2003).

O TF não é normalmente expresso em células em contato direto com o sangue (células endoteliais e leucócitos), mas apresenta expressão constitutiva em fibroblastos subjacentes ao endotélio vascular. Células endoteliais e monócitos que, normalmente, não expressam o fator tecidual, podem expressá-lo na vigência de lesão endotelial e na presença de estímulos específicos, tais como endotoxinas e citocinas (Wilcox *et al.*, 1989). A etapa de iniciação da coagulação ocorre quando células extravasculares carreadoras de TF (fibroblastos do estroma, células mononucleares, macrófagos e células endoteliais) expõem o TF ao sangue após um dano vascular ou inflamação. O TF na superfície das células extravasculares se liga ao fator VIIa, e o complexo formado ativa pequenas quantidades dos fatores IX e X. O fator Xa associado ao seu cofator Va forma o complexo protrombinase na superfície das células carreadoras de TF. O complexo protrombinase leva à conversão de pequenas quantidades de protrombina em trombina.

Em indivíduos normais, níveis mínimos de fator VIIa estão presentes na circulação, correspondendo a aproximadamente 1% da concentração plasmática total de fator VII. O fator VIIa atravessa a barreira endotelial, podendo atingir o sistema linfático. Assim, ele pode se ligar ao TF mesmo na ausência de lesão vascular, ativando fatores IX e X quando passam pelos tecidos. Esse fenômeno, chamado de coagulação basal, não leva à formação de um coágulo em situações normais devido à

ausência de componentes de alta massa molecular, como plaquetas e o complexo FVIII/FvW, os quais levariam ao seguimento do processo para a segunda etapa, a fase de amplificação.

Na etapa de amplificação, a pequena quantidade de trombina gerada na iniciação provoca a ativação de plaquetas, que expõem seus receptores e sítios de ligação para fatores de coagulação e ativam os fatores V, VIII e XI em suas superfícies. Nesse contexto, o complexo fator VIII/FvW dissocia-se, permitindo que o FvW plasmático atue como mediador adicional na adesão e agregação plaquetária.

A etapa de propagação ocorre na superfície das plaquetas ativadas, aderidas e agregadas ao local da lesão. O fator IXa (ativado na etapa de iniciação) se liga ao fator VIIIa na superfície das plaquetas. O fator Xa, que formou o complexo protrombinase na superfície de células carreadoras de TF durante a iniciação, não pode se mover até as plaquetas ativadas. Então, os fatores IXa/VIIIa (complexo Xase) ativam o fator X diretamente na superfície plaquetária. O fator Xa rapidamente se associa com o fator Va na superfície das plaquetas, formando o complexo protrombinase. O complexo fator IXa/fator VIIIa ativa o fator X com eficiência 50 vezes maior que o complexo fator VIIa/TF. Assim, nessa etapa, o complexo protrombinase leva à conversão de grandes quantidades de protrombina em trombina, a qual por sua vez leva à clivagem do fibrinogênio à fibrina. A trombina também leva à ativação do fator XIII em XIIIa, o qual catalisa a modificação covalente entre monômeros de fibrina, formando uma rede estável. Os íons cálcio são necessários em diversos passos das reações da coagulação.

Todo o processo de coagulação é regulado por outros componentes fisiológicos circulantes. A via regulatória composta pelo plasminogênio tem um papel importante na degradação da rede de fibrina gerada pela ativação do processo hemostático. Nessa via, o plasminogênio ativado gera plasmina, que atua na degradação de fibrina em fibrinogênio e na ativação de metaloproteinases de matriz responsáveis pela degradação da matriz extracelular (Collen, 1999).

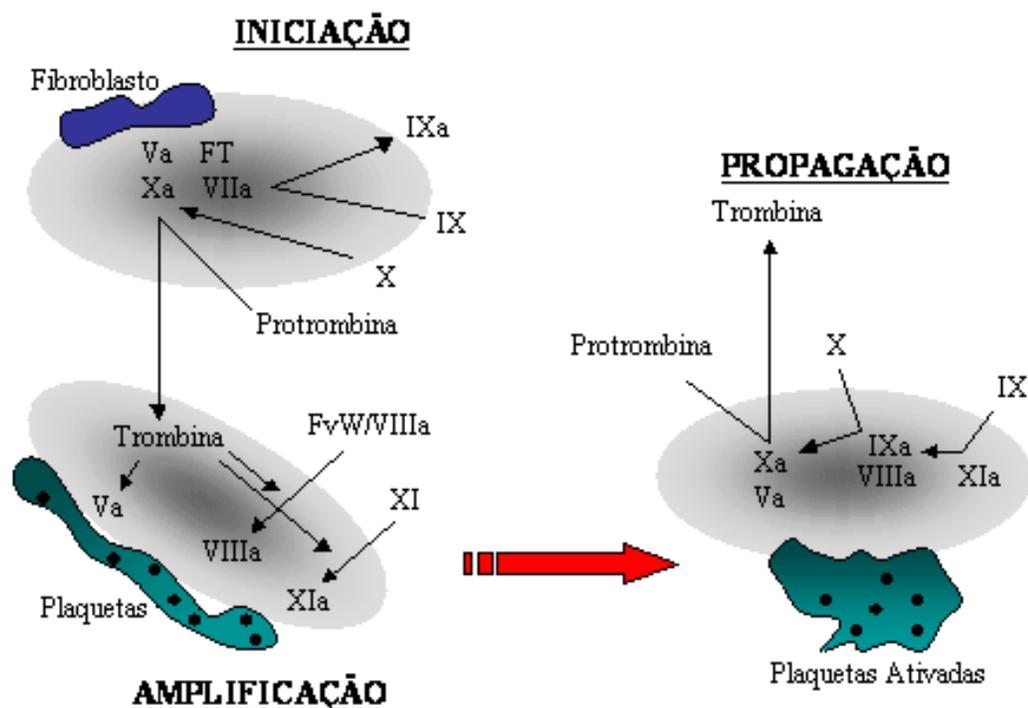


Fig.2. Modelo via celular-enzimática da cascata de coagulação sanguínea. Representação esquemática das etapas de iniciação, amplificação e propagação.

Adaptado de Hoffman & Monroe, 2001.

1.1.2. Fator VIII

O fator VIII (FVIII) é uma glicoproteína sintetizada no fígado, que é essencial para o funcionamento normal da coagulação sanguínea (Figura 1; Figura 2). A estabilidade do FVIII depende da interação não-covalente com o fator von Willebrand, que também atua na adesão e agregação plaquetárias. O FvW protege o FVIII da degradação e da endocitose, além de concentrá-lo no seu sítio de ação. Sem a ligação ao FvW, o FVIII é rapidamente degradado na circulação (Jacquemin & Saint-Remy, 1998).

O gene do FVIII está localizado na extremidade distal do braço longo do cromossomo X (Xq28) e possui 186 Kb de DNA genômico com 26 éxons que codificam uma proteína madura de 2332 aminoácidos. Cada um dos 26 éxons varia em tamanho de 69 a 3106pb. Os íntrons representam cerca de 95% do gene (Gitscheir *et al.*, 1984), e, desde que o gene do FVIII foi clonado em 1984, um grande número de mutações causadoras de doenças têm sido descritas.

Na sua forma nativa, o FVIII consiste nos domínios designados A, B e C (NH₂-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH) (Kane & Davie, 1988). A trombina ativa o FVIII através de clivagem proteolítica em resíduos de arginina entre os domínios A1 e A2, A2 e B e B e A3, resultando em um heterotrímero ativado (Figura 3) que consiste de duas cadeias pesadas e uma cadeia leve (Fay *et al.*, 1991). Ao ser clivado pela trombina, o FVIII sofre uma alteração na sua conformação, levando a liberação do FvW e a ligação a fosfolipídeos de membrana. Essa ligação permite a interação do FVIII com o fator IX, ativando-o (Jacquemin & Saint-Remy, 1998). O fator VIII serve de cofator do fator IXa na ativação do fator X, formando o complexo 'Xase'. Sem a função normal do FVIII podem ocorrer sangramentos anormais em um indivíduo.

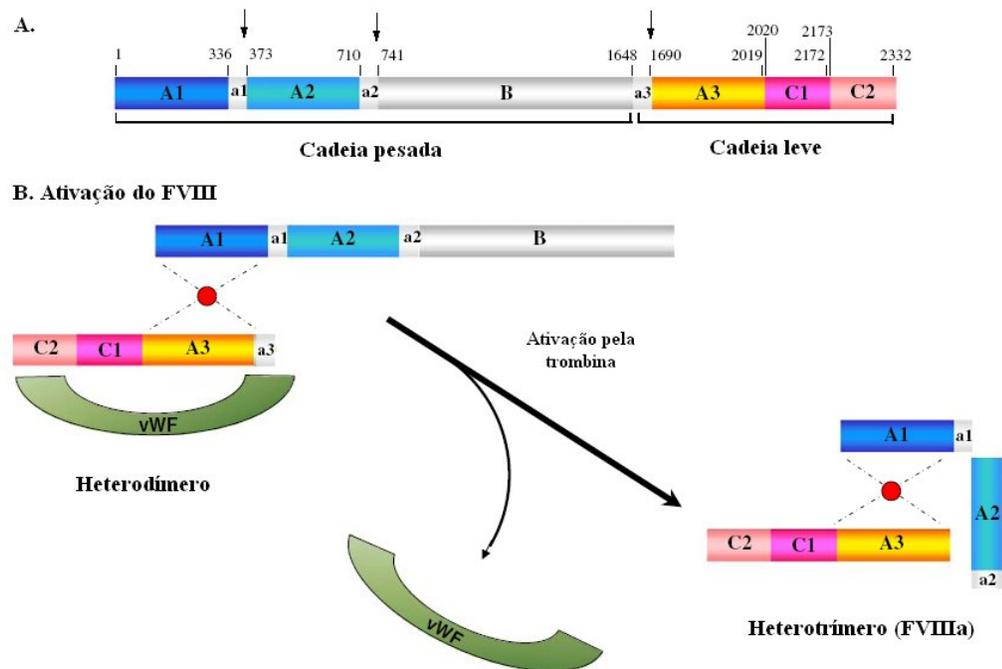


Fig.3. Estrutura e ativação do FVIII. A. estrutura primária do fator VIII e seus domínios. Os sítios de clivagem pela trombina são Arg 372 no sítio a1, Arg 740 no sítio a2 e Arg 1689 no sítio a3 (indicados pelas flechas). B. O FVIII é lançado na circulação como um heterodímero com cadeia pesada (domínios A1a1A2a2-B) e cadeia leve (domínios a3A3C1C2), associados por um íon metálico divalente. Após a clivagem proteolítica pela trombina, o FVIII é ativado e forma um heterotrímero de duas cadeias pesadas (domínio A1 de 50-kDa e A2 de 43-kDa) e uma cadeia leve (fragmento A3C1C2 de 73-kDa). O FVIII ativado consiste de uma subunidade A1 associada por uma ligação divalente metálica com a cadeia leve e uma subunidade livre associada com o domínio A1 através de ligação iônica. Adaptado de Lavigne-Lissalde *et al.*, 2009.

1.2. HEMOFILIA A

A hemofilia A é uma das doenças hemorrágicas mais frequentes da via intrínseca da cascata de coagulação sanguínea. Ela é causada pela redução da atividade do fator VIII da coagulação, devido a alterações no gene desse fator (Gitscheir *et al.*, 1984). A ausência ou diminuição da atividade do fator endógeno dificulta a geração de trombina e resulta na ausência da consolidação do coágulo de fibrina, com falha no reparo da lesão endotelial. O padrão de herança é recessivo ligado ao X e afeta aproximadamente 1 em cada 5000 nascimentos masculinos (Kazazian HH Jr. *et al.*, 1995). No Rio Grande do Sul, a prevalência estimada é de 1:11.700 homens (Alexandre & Roisenberg, 1985).

As diferentes mutações no gene do FVIII resultam em três diferentes categorias de hemofilia A: hemofilia A grave, quando o nível de FVIII no plasma do paciente é < 1% do que o FVIII encontrado no plasma normal, hemofilia A moderada (1-5%) ou hemofilia A leve (5-40%) (White *et al.*, 2001). A sintomatologia, caracterizada por sangramentos, depende da atividade de FVIII residual no plasma. As hemorragias podem ser espontâneas ou precedidas por traumas, podendo ocorrer sob a forma de hematúria, epistaxe, melena/hematêmese, ou se apresentarem como hematomas, sangramentos retroperitoneais, intra-articulares e até mesmo intracranianos (Rezende *et al.*, 2005). Na hemofilia A grave, sangramentos espontâneos em articulações e músculos são os sintomas mais comuns. Pacientes são diagnosticados normalmente no primeiro ano de vida, e, na ausência de tratamento profilático, apresentam de dois a cinco episódios de sangramentos espontâneos por mês, que podem levar a morte por perda excessiva de sangue se não contidos. Já os indivíduos com hemofilia moderada raramente têm sangramentos espontâneos, mas hemorragias ocorrem após um trauma pequeno. Em hemofílicos leves, sangramentos anormais ocorrem com cirurgias, extrações dentárias e traumas maiores (Brower & Thompson, acesso em Maio 2010). A frequência de hemofílicos graves é de 50%, de moderados é de 30% e de leves 20% (Antonarakis *et al.*, 1995).

O diagnóstico da doença é realizado através da observação dos sintomas e da execução dos testes de triagem da cascata de coagulação, dosagem do fator VIII e do fator von Willebrand. Um hemofílico A apresenta níveis de FVIII baixos e de FvW normais. Ainda, utilizando-se dos conceitos de via intrínseca e extrínseca, os

hemofílicos A apresentam o tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA) aumentado, pois ele mede a atividade *in vitro* da via intrínseca de coagulação.

Conforme a revisão feita por Zhang *et al.* (2009), o tratamento dos pacientes envolve terapia de reposição do FVIII, utilizando-se preparações derivadas de plasma humano, como o FVIII purificado, que contém o FvW, ou o obtido por técnicas de DNA recombinante. Alguns concentrados de plasma são destinados para o uso doméstico e podem ser auto-administrados, seja regularmente para prevenir o sangramento ou no primeiro sinal de sangramento. A terapia de substituição é efetiva na maioria dos casos, mas alguns pacientes iniciam a formação de anticorpos contra o fator infundido, denominados inibidores. Por esse motivo, a hemofilia vem sendo um dos principais alvos de terapias moleculares. A terapia ideal envolveria a reparação da mutação que causa a doença, para então permitir que o gene reparado seja expresso sob controle de seus elementos regulatórios normais. Essa abordagem pode ser possível no futuro, mas atualmente permanece em estágios de desenvolvimento pré-clínico (Lillicrap *et al.*, 2006).

1.2.1. Mutações no Gene do FVIII e a Hemofilia A

A hemofilia A é uma doença com grande heterogeneidade clínica, devido à enorme variedade de mutações descritas no gene do FVIII. Dependendo da mutação, a gravidade e a resposta ao tratamento são diferentes. Mutações de ponto são os defeitos genéticos mais comuns, seguidos pelas deleções e pelos casos de inserções e inversões, considerando todas as gravidades da doença. Uma mutação recorrente, a inversão do intron 22, é responsável por aproximadamente metade dos pacientes graves afetados: o gene é invertido, como resultado de uma recombinação homóloga intracromossomal entre uma cópia de uma sequência de 9,5Kb conhecida como *int22h-1* e uma de duas outras regiões homólogas teloméricas (*int22h-2* e *int22h-3*) (Lakich *et al.*, 1993). Outra mutação recorrente baseada em um mecanismo similar é identificada no íntron 1, onde uma cópia de 1Kb *int1h-1* pode recombinar com uma região homóloga extragênica, levando à ruptura do gene pela inversão e separação do éxon 1 do resto do gene (Bagnall *et al.*, 2002). Os defeitos mais comuns no gene do FVIII na hemofilia A grave são essas inversões, que ocorrem em 30-50% e 2-5% dos pacientes, respectivamente (Lakich *et al.*, 1993; Bagnall *et al.*, 2002). Não há

registros dessas duas inversões em hemofílicos com formas moderadas ou leves (Rossetti *et al.*, 2004).

Segundo Salviato *et al.* (2007), inversões, grandes deleções e mutações *nonsense* correspondem a 71% de todas as mutações que ocorrem no gene do FVIII em casos graves. Outras mutações que causam hemofilia A são muito diversificadas, sendo descritas atualmente mais de 950, das quais 270 em hemofílicos graves (Hamsters, acesso em 22 de Junho de 2010).

1.2.2. Desenvolvimento de Inibidores Contra o FVIII

A hemofilia A é tratada com terapia de reposição do FVIII, mas 25-30% dos pacientes graves e 5% das outras formas serão refratários ao tratamento, e iniciarão a formação de anticorpos contra o fator infundido, denominados inibidores (Addiego *et al.*, 1993; Schwaab *et al.*, 1995). Esses inibidores tornarão o tratamento ineficaz e representam a complicação mais severa apresentada durante o tratamento dos pacientes hemofílicos (Scandella *et al.*, 1993). A incidência de inibidores em diferentes populações de hemofílicos A é muito ampla, variando de 7 a 30% (Lusher *et al.*, 1993), sendo que no Brasil ela foi estimada em torno de 20% (Rieger & Roisenberg, 1999), considerando os pacientes com todas as formas de hemofilia A. No Rio Grande do Sul a incidência de inibidores nos hemofílicos graves é de 40% (Leiria *et al.*, 2008).

Inibidores contra o FVIII são classificados em tipo I ou de alta resposta e tipo II ou de baixa resposta. Inibidores do tipo I são anticorpos que inibem completamente o fator VIII devido à alta afinidade, ligação dependente de dose e irreversível, que segue uma cinética de segunda ordem. Títulos do inibidor de tipo I apresentam-se altos após infusões repetidas de concentrados de fator VIII e mantêm-se elevados mesmo na ausência de tratamento (estímulo), podendo ser detectados durante meses e até anos (resposta anamnésica) (Aly & Hoyer, 1992; Aly *et al.*, 1992). Inibidores do tipo II não inibem completamente a função do FVIII, não apresentam resposta anamnésica, possuem baixa afinidade, com ligação independente da dose e reversível (Aly & Hoyer, 1992; Aly *et al.*, 1992).

Quando há suspeita de desenvolvimento de inibidor em um paciente, por causa de falhas terapêuticas, ele deve ser testado utilizando o ensaio Bethesda para inibidor (*Bethesda inhibitor assay* - BIA). Recomenda-se a realização do teste em intervalos regulares durante os primeiros 50 dias de tratamento, que é o período de

maior risco para desenvolvimento de inibidor. Passadas as primeiras infusões, se recomendam testes anuais (Kempton & White, 2009).

1.2.2.1. Mecanismo de Formação dos Inibidores

O sistema imune humano pode discriminar o próprio do não próprio. O desenvolvimento da tolerância a antígenos próprios, incluindo o FVIII, inicia durante a embriogênese em torno do final do primeiro trimestre de gravidez, quando precursores linfóides primitivos começam a transitar e maturar no timo, e geralmente é completado ao nascimento, sendo mantido durante a vida adulta. Esse mecanismo de tolerância é feito predominantemente através da deleção de células T auto-reativas (White *et al.*, 2005). Durante a sua maturação no timo, linfócitos T imaturos sofrem seleção negativa (o epitélio tímico apresenta antígenos próprios para as células T imaturas, e o repertório que reagir ao próprio com alta afinidade é eliminado por apoptose). Segundo White *et al.* (2005), é possível que na hemofilia A, a ausência de fator VIII não permita a seleção negativa de células T que o reconhecem com alta afinidade, pois não há fator para ser apresentado como antígeno próprio pelo timo. Assim, após infusão, ele é visto como uma proteína estranha e é apresentado pelas células apresentadoras de antígenos (*Antigen Presenting Cells* - APCs) através de moléculas chamadas complexo principal de histocompatibilidade (MHC) ou antígeno leucocitário humano (HLA). Tanto esse mecanismo de tolerância central quanto o periférico são importantes para a manutenção da tolerância. Células T autorreativas são encontradas na periferia mesmo após a seleção do timo, e o mecanismo de tolerância periférico (supressão pelas células T regulatórias) se torna importante, sendo um alvo potencial para tratamento de doenças autoimunes (André *et al.*, 2009).

A capacidade de montar uma resposta imunológica contra o FVIII depende da presença de linfócitos B e T específicos (Figura 4). A ausência ou perda de função de qualquer uma dessas células resulta em falta de resposta ou tolerância (Jacquemin & Saint-Remy, 1998). A indução da resposta humoral é dependente de células T, havendo interação entre células T_{H1} , T_{H2} e T_{H3} que reconhecem especificamente o FVIII (Reding *et al.*, 2000). Os inibidores em hemofilia A consistem em anticorpos policlonais do tipo IgG (Fulcher *et al.*, 1987). A maioria desses anticorpos pertence ao subtipo IgG₄, embora esse subtipo seja pouco encontrado na fração de IgG no plasma normal. Entretanto, os subtipos IgG₁ e IgG₂ também são encontrados (Astermark, 2006a).

As citocinas também são mediadores importantes da resposta imune. Elas determinam o tipo de célula que vai responder, o que influencia no tipo de resposta. Células T_{H1} secretam interleucina (IL) 2, interferon- γ e fator de necrose tumoral (TNF)- β e medeiam as respostas celulares, como a ativação de células T citotóxicas, embora também possam ter papel em respostas humorais. Células T_{H2} secretam IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, promovem ativação de células B e medeiam a resposta humoral. Em hemofílicos que desenvolvem inibidores, essas citocinas também medeiam a troca de classe do anticorpo para IgG₄, conforme revisão de Astermark (2006b). Nesses pacientes, títulos mais baixos de anticorpos IgG são correlacionados com a predominância de resposta mediada por T_{H1} (IgG₁ e IgG₂), enquanto pacientes com títulos mais altos e anticorpos IgG₄ têm resposta T_{H2} (Reding *et al.*, 2002). Pacientes com inibidor persistente são tipicamente classificados como produtores de alta resposta (título de inibidor com pico >5 unidades Bethesda (UB) mL⁻¹) ou baixa resposta (títulos \leq 5UB mL⁻¹) (White *et al.*, 2001). Pacientes com inibidor transiente (tipo II) geralmente não produzem altos títulos, e os inibidores desaparecem espontaneamente em alguns meses sem nenhuma mudança no tratamento. Os mecanismos patofisiológicos que explicam e determinam o tipo de resposta imune não são conhecidos, e não é possível prever qual tipo de inibidor será encontrado em cada paciente (Astermark, 2006a).

O fenótipo do MHC de classe II clássico do paciente determina se peptídeos derivados do FVIII vão ser apresentados às células T (Astermark, 2006b). Há várias isoformas do MHC classe II agrupadas em três famílias: DR, DQ e DP. Cada isoforma liga um conjunto de peptídeos diferentes (Rammensee *et al.*, 1995). Uma dada molécula do MHC pode apresentar mais de uma sequência de aminoácidos em uma proteína ou nenhuma sequência, não oferecendo nenhum sinal para as células T se ativarem. A extensão da molécula de FVIII que é reconhecida como própria depende de quanto da molécula é sintetizada. Qualquer parte da molécula que for sintetizada irá induzir tolerância a essa parte, desde que o indivíduo possua a sequência correta do MHC II capaz de apresentar os peptídeos dessa parte (White *et al.*, 2005).

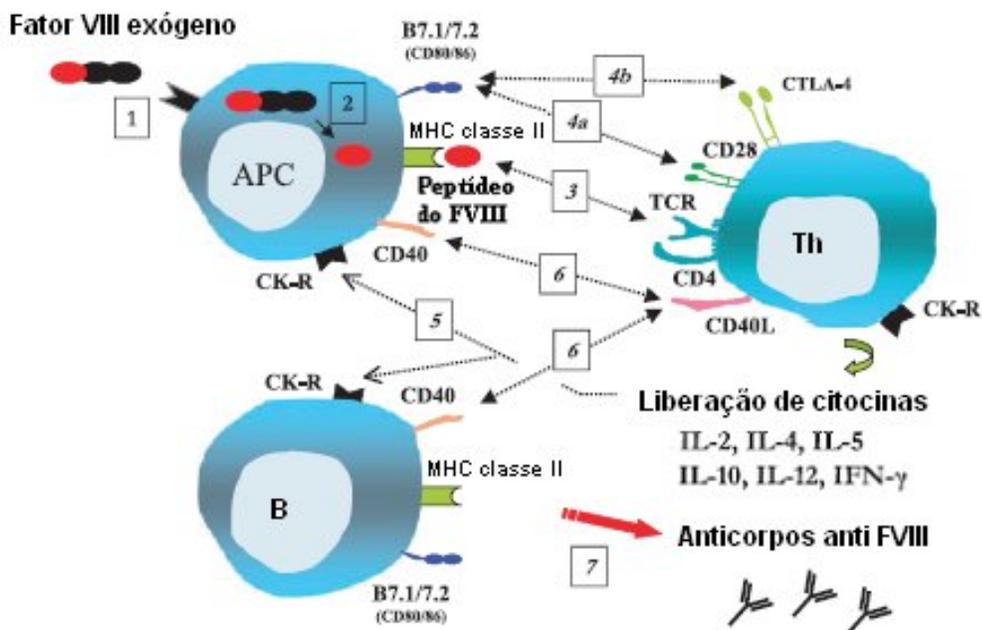


Fig.4. Formação de inibidores contra o fator VIII em hemofilia A. O fator exógeno infundido liga às células apresentadoras de antígenos (APCs) [1]. Após a endocitose, oligopeptídeos serão formados por clivagem proteolítica [2]. Esses peptídeos ligam ao MHC de classe II que possui afinidade a esta sequência, que será apresentada. O complexo pFVIII-MHC é então transferido para a membrana da célula e apresentado aos receptores das células T (TCR-CD3) de linfócitos T_H $CD4^+$ que reconhecem especificamente os fragmentos derivados do FVIII, em órgãos linfóides secundários [3]. Sinais co-estimulatórios são providos pela ligação das moléculas B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) das APCs ao CD28 nas células T [4a] para ativar completamente os linfócitos T e estimular a liberação de citocinas [5]. A subsequente ligação dessas citocinas aos receptores correspondentes (CK-R) estimula genes da resposta imune e moléculas co-estimulatórias na superfície de células B e T [6]. A ação de citocinas e moléculas co-estimulatórias, incluindo interação entre CD40 e CD40L, induz a proliferação de células B específicas contra o FVIII a se diferenciarem e produzirem anticorpos anti FVIII [7]. A ativação de células T_H é diminuída pela ligação competitiva do CTLA4 a moléculas B7 nas APCs [4b]. Adaptado de Astermark, 2006b.

Vários aspectos permanecem não esclarecidos a respeito do desenvolvimento de inibidores. Por exemplo, a localização onde o FVIII terapêutico encontra o sistema imune pela primeira vez, o tipo de APCs envolvidas no processo e o sítio onde a resposta imune anti FVIII se desenvolve. O baço tem um papel crítico como um ponto de encontro na iniciação de respostas imunes específicas, pois possui grande número de células dendríticas, macrófagos e células B, que têm acesso imediato a antígenos circulantes no sangue, permitindo uma rápida resposta imune. O FVIII terapêutico também pode ser capturado por APCs em sítios de sangramento, e então transportado para órgãos linfóides secundários, já que sítios de sangramento e coagulação criam um microambiente pró-inflamatório (André *et al.*, 2009). Os diferentes tipos de APCs também podem implicar em uma resposta diferenciada. As células dendríticas são provavelmente as mais potentes APCs.

Pelo menos cinco epítomos na molécula do FVIII são identificados como alvo dos anticorpos na maioria dos pacientes com inibidor. Dependendo da localização do epítopo alvo, diferentes mecanismos de ação de anticorpos anti FVIII têm sido descritos: (i) bloqueio da ligação do FVIII a um de seus ligantes por impedimento estérico, (ii) aumento do *clearance* do FVIII no plasma e (iii) degradação catalítica (Scandella *et al.*, 1995; Scandella, 1996; Scandella *et al.*, 1998).

Embora toda molécula do FVIII possa potencialmente servir como alvo para os anticorpos (Figura 5), experimentos indicam que as principais áreas de ligação são o domínio A2 e a cadeia leve (Scandella *et al.*, 1989). Inibidores que atuam por impedimento estérico bloqueiam a função procoagulante do FVIII por quebrar a ligação do fator com um de seus ligantes (fosfolipídeos, FvW, FIX ou FX). Desses inibidores, 68% são direcionados contra os domínios A2/C2 (Scandella *et al.*, 1993; Tiarks *et al.*, 1992). Inibidores anti A2 afetam interações entre o domínio A2 e o FIXa de um modo não competitivo, resultando na formação de um complexo tenase intrínseco inativo (Scandella, 1999). Anticorpos anti C2 agem impedindo a ligação do fator VIIIa com o FvW e a ligação a fosfolipídeos plaquetários (Saenko *et al.*, 1994; Foster *et al.*, 1990). Os outros mecanismos envolvem inibidores que geram imunocomplexos com o FVIII, aumentando o seu *clearance* da circulação (Lavigne-Lissalde *et al.*, 2009). Ainda outro mecanismo inibitório inclui a ligação a novos epítomos formados pelo complexo FVIII/FvW, que irá impedir a dissociação do complexo, inibindo a clivagem pela trombina e proporcionando um efeito catalítico ao induzir a clivagem proteolítica do FVIII (Astermark, 2006a).

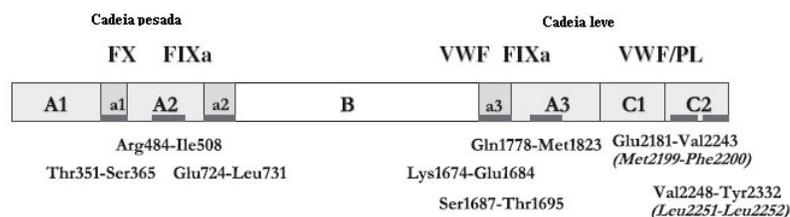


Fig.5. Principais epitopos do fator VIII. Modelo esquemático que mostra os domínios do fator VIII e a localização dos principais epitopos que se ligam a anticorpos anti FVIII, nos domínios a1, A2, a2, a3, A3 e C2. Adaptado de Astermark, 2006a.

1.2.2.2. Fatores de Risco para Formação de Inibidores

A maioria, mas não todos os indivíduos que desenvolvem anticorpos anti FVIII o fazem no início da vida, após um número médio de 9-12 tratamentos com fator exógeno. Entretanto, não há nenhuma idade provável ou número de tratamentos realizados que fazem um indivíduo completamente seguro no risco de desenvolver inibidor (Salviato *et al.*, 2007).

Tanto fatores genéticos quanto não-genéticos influenciam a suscetibilidade dos pacientes a desenvolver inibidores. Entre os fatores genéticos, o tipo de mutação do gene do FVIII, a etnia, a história familiar de inibidor, o genótipo HLA e polimorfismos em genes de citocinas parecem estar envolvidos. Características do tratamento (tipo e pureza do concentrado de fator VIII utilizado), idade de início do tratamento, doses iniciais de concentrado, cirurgias, frequência de infusões antes do desenvolvimento de inibidor, intensidade do tratamento e infecções associadas estão entre os fatores não-genéticos (Zhang *et al.*, 2009).

Estudos genéticos em pacientes com inibidores devem considerar as duas áreas de grande variação: a mutação que causou a doença e o genótipo de moléculas do seu sistema imunológico. Geralmente, mutações que resultam na ausência ou truncamento da proteína do FVIII estão associadas com a incidência maior de formação de inibidor (Fakharzadeh & Kazazian, 2000). Essas mutações incluem as inversões dos introns 1 e 22, grandes deleções e mutações *nonsense* (Astermark, 2006b). A incidência deve ser menor em pacientes cuja mutação do FVIII ainda permite que certa quantidade de FVIII esteja presente na circulação (Zhang *et al.*, 2009).

Um banco de dados que lista as mutações do gene do FVIII (HAMSTeRS) foi publicado em 1996 e é regularmente atualizado. A prevalência de inibidores em relação a diferentes mutações no gene do FVIII foi analisada em 912 pacientes com hemofilia A desse banco de dados. A partir dessa análise, observa-se que mutações *missense*, pequenas deleções e mutações em sítios de *splicing* são consideradas de baixo risco para desenvolvimento de inibidor. As pequenas deleções introduzem um códon de terminação prematuro, o que sugere que a incidência de inibidor deve ser a mesma que em mutações *nonsense*, mas, isso não ocorre, provavelmente por mecanismos de reparo que restauram a fase de leitura até uma extensão suficiente para produção de pequena quantidade de fator que toleriza o paciente. A incidência de inibidores em casos que possuem códons de terminação prematuros varia de acordo com o éxon em que o códon de terminação ocorre. Seis éxons (14, 16, 18, 23, 24, 26) somam a maioria dos inibidores (59%) (Tuddenham & Mcvey, 1998).

Segundo Tuddenham & Mcvey (1998), em um estudo comparando pacientes graves, leves e moderados (Tabela 1), grandes deleções e mutações de ponto no fenótipo grave estão associadas com maior incidência de inibidor. Em contraste, mutações de ponto no fenótipo leve ou moderado têm baixa incidência de inibidor. Uma explicação para este fato é que as mutações de ponto em pacientes graves introduzem códons de terminação prematuros, que levam a falha na produção de FVIII detectável no plasma, e o sistema imune considera o fator infundido como estranho, enquanto em pacientes leves as mutações de ponto permitem a produção de pouca quantidade de proteína ou quantidade normal não funcional, sendo mais tolerantes. Nesse estudo, indivíduos com inversões possuem incidência similar de inibidores quando comparados com indivíduos que possuem deleções.

Tabela 1. Frequência de inibidores por tipo de mutação.

Genótipo	Hemofílicos graves, %	Hemofílicos leves e moderados, %
Inversão	35-40	-
Inserção	8	-
Deleção >200pb	32	-
Deleção <200pb	6	-
Mutação de ponto	23	3

Fonte: Tuddenham & Mcvey (1998).

O genótipo do MHC do paciente também proporciona uma variação individual na suscetibilidade ao desenvolvimento de inibidores. Em estudos realizados com pacientes hemofílicos A e com inversão do intron 22, alelos do MHC classe I A3, B7 e C7 e alelos do MHC classe II DQA0102, DQB0602 e DRB1501 foram mais frequentemente encontrados em pacientes com inibidor (Oldenburg *et al.*, 1997; Hay *et al.*, 1997). Outra fonte de variabilidade é o repertório de células T presentes em um indivíduo.

Embora a presença de inibidores na maior parte dos casos esteja correlacionada com a presença de mutações graves, uma proporção de pacientes desenvolve inibidores mesmo na presença de mutações menos graves (Salviato *et al.*, 2007). Ainda, muitos pacientes com mutações de alto risco e genótipos desfavoráveis não desenvolvem inibidores, e a razão para esse fato não é clara (Bafunno *et al.*, 2009). Provavelmente isso ocorre porque eles não reconhecem o FVIII como estranho ou porque o fenótipo do MHC, e até mesmo de outros genes que influenciam a resposta imune não permite que a resposta imunológica inicie. É sugerido que alguns pacientes não possuem a ‘combinação’ certa entre genótipo do sistema imune e o defeito da molécula do FVIII, como no exemplo da figura 6 (White *et al.* 2005). Várias moléculas do sistema imune podem influenciar essa ‘combinação’, e não apenas o MHC de classe II. Neste estudo será analisada a influência de outras moléculas do sistema imune na formação de inibidores.

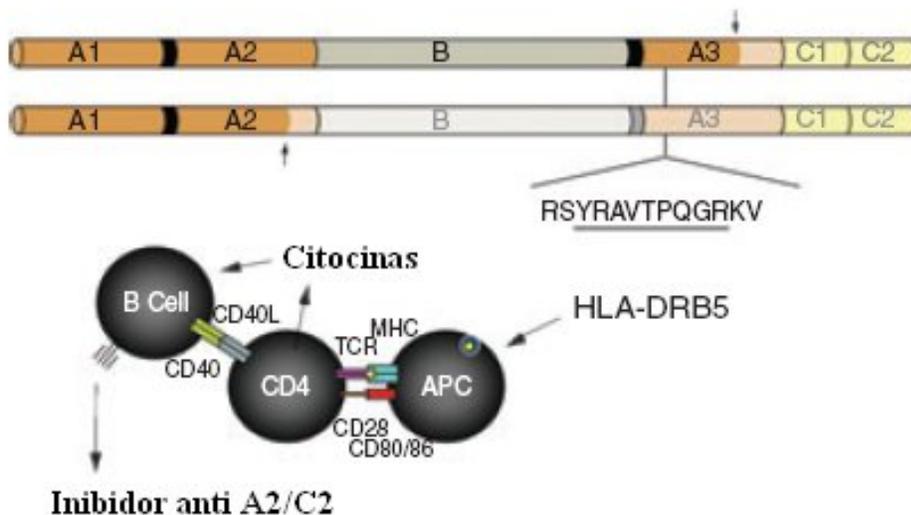


Fig.6. Defeito molecular no FVIII e sequência do HLA no desenvolvimento de inibidor.

Dois indivíduos hipotéticos, um com uma mutação *nonsense* no final do domínio A3 (acima, o sítio da mutação é indicado pela flecha), e outro com uma mutação *nonsense* no domínio A2 (abaixo, a flecha indica o sítio da mutação), são ilustrados. Nos dois indivíduos, a molécula truncada é expressa até o ponto da mutação. Ambos são homocigotos para a molécula de classe II HLA-DRB5, que apresenta a sequência YRAVTPQGR encontrada no domínio A3 do fator VIII humano. No indivíduo mostrado no topo, se espera que essa sequência seja reconhecida como própria. Já no indivíduo abaixo, a sequência YRAVTPQGR não é expressa e não é reconhecida como própria. Infusões de FVIII exógeno levariam ao reconhecimento da sequência YRAVTPQGR pelo HLA-DRB5, podendo resultar na formação de anticorpos. Alguns indivíduos não possuem a combinação certa de defeito molecular e tipo de MHC para gerar resposta imune. Adaptado de: White *et al.*, 2005.

Polimorfismos em genes que levam a uma função alterada de citocinas ou seus receptores também podem causar um desequilíbrio da resposta imune. Por exemplo, polimorfismos nos genes da IL-4 e IL-10 são associados com desenvolvimento de lúpus eritematoso, *miastenia gravis* e granulomatose de Wegener. Ainda, polimorfismos em genes como CTLA-4, IL-4, IL-5, IL-10, IL-6 e TNF- α estão sendo analisados em alguns estudos para verificar sua relação com desenvolvimento de inibidores. Astermark (2006b) estudou um polimorfismo na região promotora do gene da IL-10 (alelo 134) e encontrou grande associação com a formação de inibidores. Uma forte ligação entre polimorfismos no gene do TNF- α e o

desenvolvimento de inibidor em irmãos hemofílicos também foi encontrada no estudo MIBS (*Malmo International Brother Study group*) (Astermark *et al.*, 2006).

Outro fator genético de risco para desenvolvimento de inibidores é a história familiar prévia de produção dos mesmos. Em um estudo feito por Astermark *et al.* (2005), foi encontrada concordância entre famílias de 78,3%. Uma maior incidência de inibidor é observada entre irmãos, comparando com outros parentes hemofílicos. Se cada membro de uma família de hemofílicos tem a mesma mutação, e outros fatores genéticos além dessas mutações estiverem envolvidos, o risco da formação de inibidor deve ser maior em irmãos hemofílicos do que em outros parentes (primos, sobrinhos, avôs, etc.). Foi reportado que o risco de um irmão de um paciente com inibidor também desenvolver essa resposta é de 50%, enquanto o risco de outro membro da família desenvolver é de 10%. Isso suporta a hipótese de que outros fatores genéticos, além das mutações que levaram a hemofilia, têm papel no desenvolvimento de inibidores.

A etnia também é outro fator genético que pode influenciar no desenvolvimento de inibidores, e tem sido reportada em vários estudos de meta análise. A prevalência de inibidores em pacientes graves de origem afro-americana e latina é duas vezes maior que em caucasianos (Scharrer *et al.*, 1999). O espectro de mutações do FVIII não difere nas raças, então se acredita que a variação deve ser atribuída a fatores genéticos relacionados ao sistema imunológico.

No entanto, se o desenvolvimento de inibidores fosse puramente genético, gêmeos monozigóticos deveriam apresentar o mesmo fenótipo. Entretanto, gêmeos discordantes têm sido descritos, indicando que fatores não-genéticos influenciam a resposta imune (Astermark *et al.*, 2001).

Goudemand *et al.* (2006), em uma revisão epidemiológica sobre inibidores, investigaram a influência de diferentes concentrados de FVIII na formação de inibidores. Sessenta e dois pacientes foram tratados com o mesmo FVIII purificado de plasma, contendo FvW, e 86 pacientes foram tratados com FVIII recombinante. Pacientes tratados somente com um produto derivado de plasma tiveram menor incidência (0-12.4%) do que os tratados com fator recombinante (36-38.7%). Produtos derivados de plasma com diferentes concentrações de FvW parecem impedir a ligação do inibidor ao FVIII (Ghosh & Shetty, 2009). Em um estudo retrospectivo na França, 11% dos pacientes tratados com FVIII derivado de plasma desenvolveram inibidor, comparado com 31% em tratados com o recombinante.

Apesar desses dados, a determinação da influencia do tipo de produto utilizado no desenvolvimento de inibidor requer mais estudos em coortes mais definidas.

Outro fator de risco não-genético é a idade de início do tratamento com infusão de FVIII. Lorenzo *et al.* (2001) reportaram que a incidência de inibidor em pacientes que começaram o tratamento antes dos seis meses de idade é de 41%, comparada com 29% ao iniciar dos 6-12 meses e 12% após um ano. O risco do desenvolvimento é maior nos primeiros 50 dias de tratamento, com reações mais raras ocorrendo após 200 dias de exposição. Além disso, pacientes que se submetem a cirurgias ou que sofrem traumas com sangramento precisam de tratamento mais intensivo, e isso pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de inibidor, já que o ambiente de injúria pode ativar células do sistema imune que venham a reconhecer o FVIII infundido (Ghosh & Shetty, 2009). Doenças infecciosas e imunização associada com a primeira infusão de concentrados de FVIII ativam o sistema imune da mesma forma, mas ainda mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese. O modo de administração, como uma única injeção ou infusão contínua, também parece influenciar na formação de inibidores. A infusão contínua parece oferecer mais risco para o desenvolvimento de inibidor (Zhang *et al.*, 2009).

1.2.2.3. Tratamento de Pacientes com Inibidor

Intervenções terapêuticas para modular a resposta imune ao fator infundido precisam ser consideradas, para diminuir o incômodo e a enorme implicação que os inibidores causam na rotina dos pacientes hemofílicos. Para esse propósito, uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos é requerida. A administração por longos períodos de altas doses de FVIII, referida como terapia de imunotolerância, parece eliminar inibidores em uma grande proporção de pacientes por um mecanismo ainda não esclarecido (Mariani & Kroner, 2001). É importante que essa terapia se inicie o mais cedo possível, quando os níveis de inibidor ainda são baixos, para maximizar a chance de sucesso e minimizar os custos. Nenhuma correlação é encontrada entre o genótipo para o FVIII e a resposta a essa terapia, embora isso seja questionável (Salviato *et al.*, 2007). A terapia de imutolerância é efetiva em 70% a 80% dos casos (Dimichele, 2006). Vários tratamentos e abordagens são citados em

revisões bibliográficas. Tratamentos disponíveis para restaurar a hemostasia em pacientes com inibidor são baseados na administração de concentrados de protrombina ou fator VII recombinante ativado. Alternativamente, a restauração da atividade do FVIII pode ser feita pela administração de altas doses de FVIII, em conjunto ou não com a remoção de IgG do organismo, além de terapia com imunossuppressores. A remoção do baço antes de infusões contínuas de FVIII também reduz a resposta imune anti FVIII, provavelmente porque o baço é o local onde essa resposta imune se inicia (André *et al.*, 2009).

Um produto concentrado de FVIII menos imunogênico também é desejável. Dasgupta *et al.* (2007), relataram que a fagocitose do FVIII por células dendríticas depende do reconhecimento de resíduos de manose. Assim, FVIII sem resíduos de manose não é capaz de estimular clones de células T humanas *in vitro*. Outra abordagem seria mutar resíduos dos epítopos gerados do FVIII que são requeridos para a sua ancoragem no MHC II (Zhang *et al.*, 2009).

Com a identificação de determinantes de risco que influenciam o desenvolvimento de inibidores em um paciente, se poderiam identificar perfis diferentes de suscetibilidade, que poderiam ser utilizados para selecionar um tratamento mais adequado para cada um com intenção de diminuir ou abolir a formação de inibidores.

1.3. POLIMORFISMOS NO GENE DO HLA-G E A FORMAÇÃO DE INIBIDORES

O antígeno leucocitário humano (HLA)-G, descrito inicialmente em 1987 por Geraghty e colegas, pertence à família das moléculas do HLA de classe Ib não-clássicas, que também inclui o HLA-E e HLA-F. O gene do HLA-G, localizado no braço curto do cromossomo seis, próximo a região do MHC de classe I, possui alguns alelos que exibem forte desequilíbrio de ligação com o HLA-A. A estrutura do gene do HLA-G é idêntica ao do MHC classe I clássico, que é composto por oito éxons, sete introns e uma região 3' não traduzida. No entanto, no HLA-G, um códon de terminação no éxon 6 leva ao truncamento do segmento citoplasmático da proteína, que resulta na perda de 19 aminoácidos que são altamente conservados no loci do HLA clássico (Geraghty *et al.*, 1987).

O HLA-G difere das moléculas clássicas do HLA pela sua diversidade genética, expressão e funções. De fato, HLA-G exibe baixo nível de polimorfismos com apenas 36 alelos e 14 proteínas descritas, comparando com o HLA clássico que é altamente polimórfico (Robinson *et al.*, 2003). O *splicing* alternativo do transcrito primário do gene resulta em sete isoformas da proteína, sendo quatro isoformas ligadas à membrana (HLA-G1 até HLA-G4) e três isoformas solúveis (HLA-G5 até HLA-G7). HLA-G1 e HLA-G2 têm variantes solúveis que incluem 21 aminoácidos adicionais (Carosella *et al.*, 2000; van der Ven *et al.*, 2000). A expressão constitutiva de HLA-G ligado à membrana em condições não patológicas é altamente restrita a alguns tecidos (células do trofoblasto fetal, timo adulto, córnea, ilhotas pancreáticas e células eritróides), mas este gene pode ter sua expressão induzida em outras células em condições patológicas como câncer, infecções virais, doenças autoimunes e transplantes (Carosella *et al.*, 2008). Em condições fisiológicas, os monócitos e células dendríticas são os maiores produtores de HLA-G solúvel (van der Ven *et al.*, 2000).

HLA-G é predominantemente expresso na interface materno-fetal e foi primariamente associado com a tolerância materno-fetal (Rouas-Freiss *et al.*, 1997a). Hoje se sabe que tanto o HLA-G solúvel no plasma como o ligado a membranas funciona como um múltiplo imunorregulador, com importante função imunossupressora e possível indução de imunotolerância (Favier *et al.*, 2007). Os níveis de HLA-G solúvel estão aumentados no fluido amniótico durante a gravidez, assim como no plasma em casos de esclerose múltipla, artrite reumatóide, e vários tipos de tumores (Pistoia *et al.*, 2007).

Vários mecanismos de inibição do sistema imune mediados por HLA-G têm sido descritos (Figura 7). Entre eles está a inibição da atividade citotóxica de linfócitos T CD8+ e células NK (Le Gal *et al.*, 1999; Rouas-Freiss *et al.*, 1997b); inibição da proliferação de células T CD4+ e liberação de citocinas (Bainbridge *et al.*, 2000; van der Meer *et al.*, 2007); inibição da progressão do ciclo celular em células T humanas alorreativas (Bahri *et al.*, 2006); geração de novos tipos de células regulatórias T CD4+ e T CD8+ através da transferência da membrana contendo o HLA-G das células apresentadoras de antígenos para células T ativadas (trogoctose) (LeMaoult *et al.*, 2007); inibição da diferenciação de células dendríticas (Ristch *et al.*, 2005) e estimulação da secreção de IL-3, IL-4 e IL-10 (Kanai *et al.*, 2001). Está bem demonstrado que a formação dos inibidores contra o FVIII depende dos

linfócitos T, através da ativação de células T CD4+, bem como de linfócitos B e de citocinas produzidas. Dessa forma, tendo em vista que o HLA-G solúvel exerce modulação da atividade desses linfócitos, polimorfismos no gene da molécula podem ter implicação no desenvolvimento de inibidores no tratamento da hemofilia A. Os polimorfismos no gene do HLA-G têm sido associados com várias desordens. Entre elas o aborto espontâneo recorrente, preeclampsia, doenças inflamatórias e cutâneas, doenças autoimunes e alérgicas, tumores e rejeição de transplantes, como citam Castelli *et al.* (2009). A maioria dos polimorfismos do HLA-G são sinônimos e não mudam a composição de aminoácidos da proteína produzida (van der Ven *et al.*, 2000).

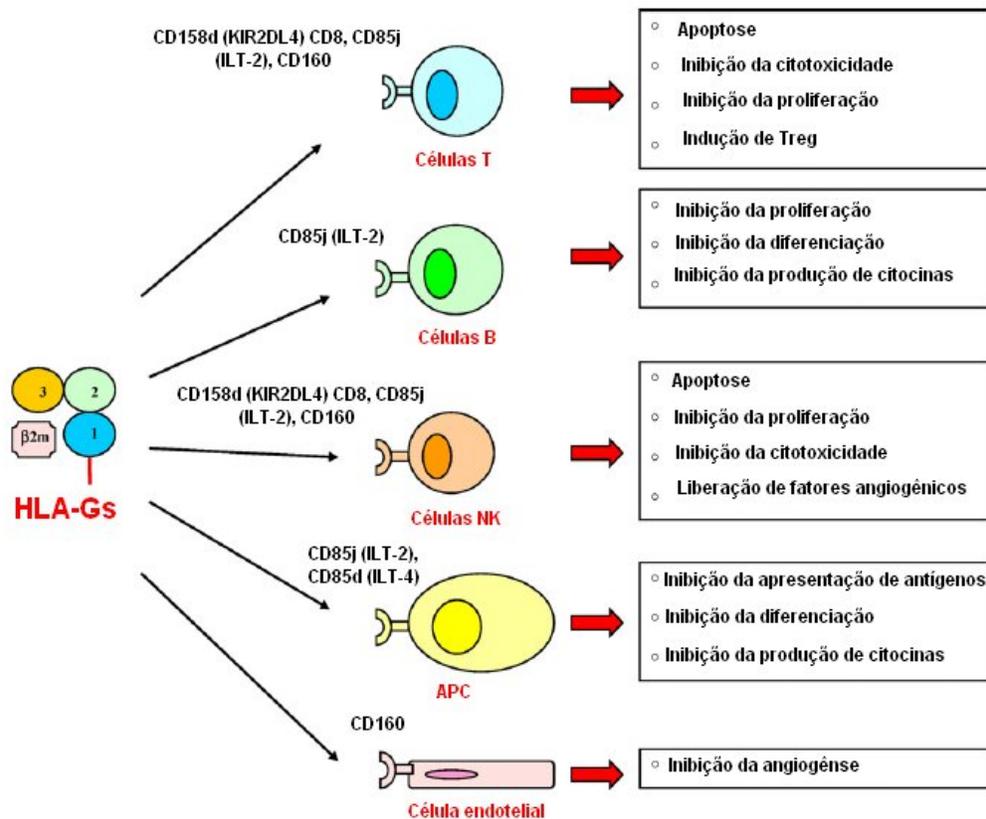


Fig.7. Atividades imunoregulatórias mediadas pelo HLA-G. As células alvo e os receptores nos quais o HLA-G solúvel se liga estão indicados. Adaptado de: Pistoia *et al.*, 2007.

Apesar da reduzida variabilidade observada na região codificadora do locus HLA-G, um alto grau de variabilidade é visto na região promotora do gene, e pode

influenciar a ligação de fatores de transcrição específicos. Além disso, a região 3' não traduzida apresenta sítios de variação potencialmente associados com a magnitude da expressão de HLA-G (Castelli *et al.*, 2009). Essa variabilidade pode estar associada a algumas patologias onde o nível de expressão do gene do HLA-G e o seu perfil de isoformas de mRNA difere em comparação com situações normais.

A região 3' não traduzida do gene do HLA-G ocorre tanto no DNA como no RNA. Ela é uma porção da sequência que flanqueia a região codificadora e que não é traduzida para proteína, que começa no meio do éxon 6, depois do códon de terminação, e termina no éxon 8, antes do sinal de poliadenilação (Atwood & Parry-Smith, 2001). Essa região oferece uma diversidade de sequências de regulação pós transcricional, onde um ou mais microRNAs (miRNA) se ligam a sítios regulatórios no mRNA e reprimem a expressão da proteína por desestabilização do transcrito, repressão da tradução ou ambos (Greener *et al.*, 2002). MicroRNAs são implicados em um grande número de processos biológicos, e alterações genéticas relacionadas a eles provavelmente são responsáveis por mais doenças humanas do que se imagina. Análises computacionais sugerem que pelo menos 30% dos mRNAs humanos são alvos de miRNAs (Bartel & Chen, 2004). Há estudos que afirmam que miRNAs têm preferência por ligação a alelos específicos da região 3' não traduzida do locus HLA-G (Tan *et al.*, 2007). Assim, o estudo dessa região é importante para identificar sítios potenciais envolvidos em variações fenotípicas e doenças (Alvarez *et al.*, 2009).

O polimorfismo de inserção/deleção de 14pb (Harrison *et al.*, 1993) (rs1704) localizado na região 3' não traduzida do gene do HLA-G parece ter um importante papel no *splicing* alternativo e foi associado com diferentes níveis de HLA-G solúvel no plasma (Chen *et al.*, 2008). Já foi encontrada associação entre esse polimorfismo e a suscetibilidade a algumas doenças inflamatórias e autoimunes. Estudos prévios indicam que os níveis de HLA-G solúvel (HLA-Gs) são maiores para indivíduos que são homocigotos para a deleção de 14pb (Chen *et al.*, 2008). Alelos do HLA-G que apresentam a sequência de 14pb têm sido associados com a menor produção de mRNA e níveis mais baixos de HLA-G solúvel. Assim, se pode hipotetizar que miRNAs que se ligam especificamente a essa região podem ser responsáveis pela menor produção de HLA-G (Castelli *et al.*, 2009). Ainda, foi reportado que uma fração dos mRNAs transcritos pelos alelos do HLA-G que possuem as 14pb são processados e removidas as primeiras 92 bases do éxon 8, incluindo o domínio rico em AU localizado nas 14pb que ligam miRNAs. Através dessa remoção de bases, o

mRNA de transcritos mais curtos é mais estável que os transcritos completos (Rousseau *et al.*, 2003). Tendo em vista esse fato, seria esperado que indivíduos homozigotos para o alelo de inserção apresentassem maior expressão de HLA-G, devido à presença dos transcritos mais estáveis. Entretanto, a estabilidade do mRNA conferida pela inserção de 14pb não parece ter efeito positivo na expressão de HLA-G. Muitos estudos reportaram a associação entre a inserção de 14pb e níveis mais baixos ou até indetectáveis de HLA-G no plasma, em homozigotos para o alelo da inserção. A contradição entre a estabilidade dos transcritos originados pelos alelos com 14pb e os níveis baixos de expressão de HLA-G observados nessa variante *in vivo* constitui um paradoxo (Veit & Chies, 2009).

Em outro estudo, no genótipo +14pb/+14pb o nível de HLA-G solúvel foi muito mais baixo que nos genótipos +14pb/-14pb e -14pb/-14pb, enquanto nenhuma diferença foi observada entre os dois últimos genótipos (Chen *et al.*, 2008). Níveis séricos de HLA-G são aumentados significativamente em mulheres grávidas, e pacientes com altos níveis de HLA-Gs após um transplante têm menor incidência de episódios de rejeição (Rousseau *et al.*, 2003). Rizzo *et al.* (2008) encontraram uma frequência aumentada de +14pb/+14pb e uma frequência diminuída de -14pb/-14pb em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico.

Outro polimorfismo localizado na região 3' não traduzida, na posição +3142 (rs1063320), parece alterar a ligação de miRNAs, influenciando assim na estrutura do RNA e a repressão da tradução mediada por miRNA (Tan *et al.*, 2007). Esse polimorfismo é caracterizado pela troca de uma citosina por uma guanina, e também já foi associado com o desenvolvimento de doenças inflamatórias (Castelli *et al.*, 2009; Cordero *et al.*, 2009). O SNP +3142C/G pode propiciar a ligação de miRNAs específicos. Estudos *in silico* e funcionais mostram que a presença de uma guanina na posição +3142 aumenta a afinidade dos miRNAs hsa-miR-148a, hsa-miR-148b e hsa-miR-152 ao mRNA do HLA-G, diminuindo a sua expressão (Tan *et al.*, 2007). Segundo Cordero *et al.* (2009), esse polimorfismo, em desequilíbrio de ligação parcial com o polimorfismo de inserção/deleção de 14pb, pode explicar de forma melhor as diferenças observadas na expressão protéica de HLA-G no plasma do que o polimorfismo de 14pb, embora o papel deste no *splicing* alternativo não possa ser esquecido. Isso poderia explicar a razão pela qual os transcritos originados do alelo +14pb, embora mais estáveis, não refletem em níveis mais altos de proteína, pois não são eficientemente traduzidos (Veit & Chies, 2009). Nesse estudo, verificamos a

influência desses dois polimorfismos no desenvolvimento de inibidores em hemofílicos A graves, com a finalidade de definir o papel do HLA-G solúvel na regulação da resposta imune que envolve esse quadro. Não há estudos prévios que correlacionem a expressão do HLA-G com o desenvolvimento de inibidores no tratamento de pacientes hemofílicos A graves. A tabela 2 mostra as frequências alélicas dos dois polimorfismos estudados no gene do HLA-G em diferentes populações mundiais.

Tabela 2. Frequências alélicas dos polimorfismos no gene do HLA-G em diferentes populações.

Etnia	HLA-G ±14pb		HLA-G +3142C/G		Referência
	Ins	Del	C	G	
Americanos	0.170	0.830	-	-	NCBI *
Japoneses	0.120	0.880	0.716	0.284	NCBI *
Africanos	0.430	0.570	0.693	0.307	NCBI *
Afro-americanos	-	-	0.543	0.457	NCBI *
Europeus	0.320	0.680	0.500	0.500	NCBI *
Brasileiros	0.370	0.630	0.420	0.580	Cordero <i>et al.</i> , 2009

* Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>, acesso em 27 de maio de 2010.

1.4. POLIMORFISMOS NO GENE PTPN22 E A FORMAÇÃO DE INIBIDORES

O gene da proteína tirosina fosfatase não receptora tipo 22 (PTPN22), localizado no cromossomo 1p13, codifica uma proteína tirosina fosfatase hematopoiética de 110-kD, também conhecida como Lyp, que consiste em um domínio fosfatase N-terminal e uma região C-terminal longa contendo vários motivos ricos em prolina (Cohen *et al.*, 1999). Proteínas tirosina fosfatases têm diversos papéis como reguladoras negativas de cascatas de sinalização estimulatórias e são reconhecidas como fundamentais para a manutenção do equilíbrio da resposta imune (Siminovitch, 2004). Há evidências bem estabelecidas de que a alteração da expressão ou atividade das PTPs está envolvida na regulação da sinalização do receptor de células T (TCR) e causa imunopatologias em camundongos (Stanford *et al.*, 2010).

Para que as células T sejam ativadas, a fosforilação de resíduos de tirosina ocorre através de um complexo processo de sinalização envolvendo proteínas

tirosina quinases (Samelson & Klausner, 1992), tirosina fosfatases (Mustelin *et al.*, 1999) e uma ampla variedade de moléculas adaptadoras (Clements *et al.*, 1999). Essas moléculas então alimentam as cascatas de sinalização citoplasmáticas que regulam funções celulares. PTPN22 demonstra atividade de repressão de respostas dependentes de células T através da associação com o domínio SH3 da Csk (Figura 8).

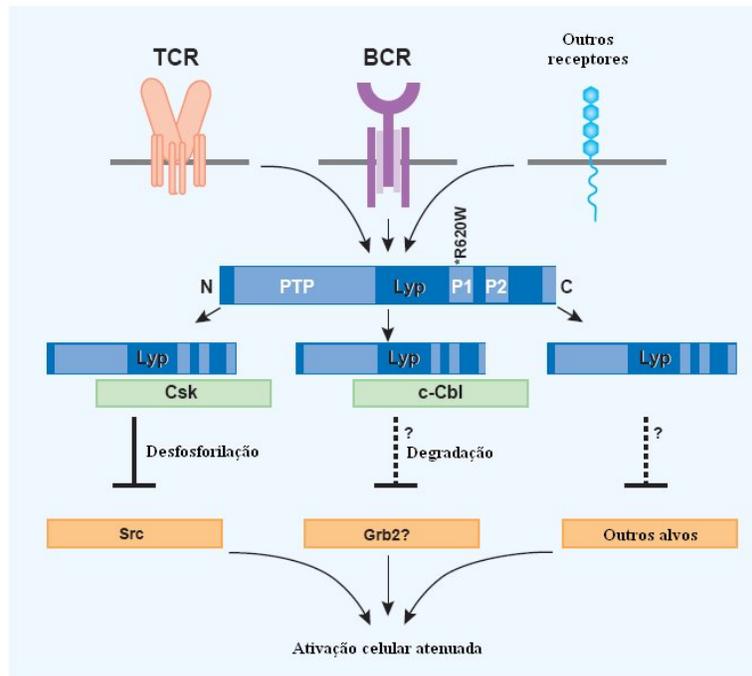


Fig.8. Sítios potenciais e conhecidos de ação da Lyp. Lyp age abaixo do TCR e possivelmente do BCR (B-cell receptor) e outros receptores promotores de crescimento, sozinha, em conjunto com a Csk, ou com c-Cbl inibindo a família de proteínas tirosina fosfatases Src e potencialmente outros alvos, atenuando assim a resposta imune. Adaptado de: Siminovitch, 2004.

Conforme revisão feita por Stanford *et al.* (2010), três relatos em 2004 documentaram a associação entre um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) C1858T (rs2476601) no éxon 14 do gene PTPN22 e diabetes tipo 1, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico e doença de Graves. Outros relatos encontraram associação entre esse polimorfismo e a doença de Addison, vitiligo, *miastenia gravis* e esclerose sistêmica. A substituição de um nucleotídeo C por T na posição 1858 leva a mudança de aminoácido na proteína, no códon 620, de arginina para triptofano (R620W), no motivo rico em prolina, que é envolvido na ligação ao

domínio Csk, interrompendo esse sítio de ligação da Lyp (Bottini *et al.*, 2004). Essa substituição aumenta a atividade fosfatase enzimática (Vang *et al.*, 2005). Assim, a presença do alelo 1858T pode levar a respostas patogênicas dependentes de células T, ou hiperreatividade. Juntos, os dados sugerem que há um envolvimento de PTPN22 na suscetibilidade tanto a doenças autoimunes sistêmicas como específicas para alguns órgãos (Siminovitch, 2004). A tabela 3 mostra as frequências alélicas do polimorfismo estudado no gene PTPN22 em diferentes populações mundiais.

Tabela 3. Frequências alélicas do polimorfismo no gene PTPN22 em diferentes populações.

Etnia	PTPN22 C1858T		Referência
	C	T	
Japoneses	0.978	0.022	NCBI *
Africanos	0.033	0.967	NCBI *
Europeus	0.858	0.142	NCBI *
Brasileiros	0.948	0.052	Chagastelles <i>et al.</i> , 2010

* Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>, acesso em 27 de maio de 2010.

A frequência do alelo 1858T foi estimada em 5.2% em controles em um estudo realizado no Brasil (Chagastelles *et al.*, 2010), onde se encontrou associação entre o alelo e o desenvolvimento de diabetes tipo 1. Segundo Bafunno *et al.* (2009), as frequências alélicas observadas para o polimorfismo PTPN22 C1858T não diferem significativamente entre pacientes hemofílicos com inibidor e pacientes sem inibidor.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente estudo faz parte de um projeto maior onde estão sendo estudados a influência de polimorfismos em diferentes genes envolvidos na regulação do sistema imune no desenvolvimento de inibidores em pacientes com hemofilia A grave.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Investigar a associação independente dos polimorfismos no gene do HLA-G (inserção/deleção de 14pb e SNP +3142C/G) e no gene PTPN22 (SNP C1858T) com o desenvolvimento de inibidores em hemofílicos A graves do sul do Brasil.
- b) Medir o desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos inserção/deleção de 14pb e SNP +3142C/G, verificando os possíveis haplótipos e diplótipos existentes e a relação destes com o desenvolvimento de inibidores.
- c) Estimar o risco de desenvolvimento de inibidores considerando a interação dos polimorfismos estudados e a presença das inversões nos introns 1 e 22.

3. ARTIGO

Artigo a ser submetido para publicação na revista *Haemophilia*

Polimorfismos em Genes Envolvidos na Regulação do Sistema Imune e o Risco de Desenvolvimento de Inibidores em Hemofílicos A Graves do Sul do Brasil

Clévia Rosset, Daiane Agostini, Leonardo Barbosa Leiria, Francisco Mauro Salzano, Eliane Bandinelli.

Resumo

A hemofilia A é uma desordem hemorrágica causada pela deficiência da atividade do fator VIII da coagulação (FVIII). O tratamento envolve terapia de reposição do FVIII, que é efetiva na maioria dos casos. Entretanto, uma das principais complicações que ocorre no tratamento desses pacientes é a formação de anticorpos (inibidores) que inibem a atividade coagulante do fator infundido. Fatores genéticos como a presença de inversões nos introns 1 e 22 no gene do FVIII contribuem consideravelmente para o risco de desenvolver inibidores. O genótipo HLA e de outros genes que regulam o sistema imune também tem papel importante no quadro. O objetivo deste estudo é avaliar se os polimorfismos de inserção/deleção de 14pb (rs1704) e do SNP +3142C/G (rs1063320) no gene HLA-G e do SNP C1858T (rs2476601) no gene PTPN22 podem conferir suscetibilidade ao desenvolvimento de inibidores em pacientes com hemofilia A grave. Foram estudados 171 pacientes eurodescendentes com hemofilia A grave, previamente genotipados para as inversões nos introns 1 e 22. Os polimorfismos foram genotipados por PCR (Ins/Del 14pb) ou PCR/RFLP (SNPs). As frequências genótípicas e alélicas em pacientes com inibidores não foram significativamente diferentes das observadas no grupo sem inibidores, para os três polimorfismos estudados. Não houve interação entre qualquer das variantes genéticas e a presença de inversões no desenvolvimento de inibidores. Além disso, nenhuma relação foi encontrada entre combinações específicas dos alelos do HLA-G e a produção de anticorpos. Os resultados obtidos sugerem a falta de associação entre os polimorfismos HLA-G \pm 14pb, HLA-G +3142C/G e PTPN22 C1858T e o desenvolvimento de inibidores em nossa população de estudo.

Introdução

A hemofilia A é uma desordem hemorrágica causada pela deficiência funcional do fator VIII (FVIII), que na sua forma ativa é essencial para o funcionamento

normal da coagulação sanguínea. A redução da atividade do FVIII ocorre por alterações no gene que o codifica. Essa diminuição da atividade dificulta a geração de trombina e resulta na ausência da consolidação do coágulo de fibrina, com falha no reparo da lesão endotelial. O padrão de herança da doença é recessivo ligado ao X, e afeta aproximadamente 1 em cada 5000 nascimentos masculinos, com incidência similar em diferentes países e populações [1].

A gravidade da hemofilia A varia dependendo da natureza da mutação do gene do FVIII. Aproximadamente dois terços dos pacientes são hemofílicos A graves porque possuem menos de 1% de FVIII funcional circulante. Hemofílicos A moderados possuem de 1-5% de FVIII funcional, enquanto leves de 5-40% [2]. O tratamento dos pacientes acometidos envolve terapia de reposição do FVIII, utilizando-se preparações derivadas de plasma humano, como o FVIII purificado, ou o obtido por técnicas de DNA recombinante [3]. A terapia de substituição é efetiva na maioria dos casos. Entretanto, 25-30% dos pacientes graves e 5% das outras formas serão refratários ao tratamento, e iniciarão a formação de anticorpos contra o fator VIII infundido, denominados inibidores [4]. Esses inibidores, frequentemente do subtipo IgG₄, tornam o tratamento ineficaz e representam a complicação mais severa apresentada durante o tratamento dos pacientes hemofílicos [5]. A incidência de inibidores em diferentes populações de hemofílicos A é muito ampla, variando de 7 a 30% [6], sendo que no Brasil ela foi estimada em torno de 20% [7].

O mecanismo de formação dos inibidores ainda não está totalmente elucidado. Tanto fatores genéticos (tipo de mutação do gene do FVIII, etnia, história familiar de inibidor, genótipo HLA e polimorfismos em genes de citocinas) quanto não-genéticos (tipo de concentrado utilizado, idade de início do tratamento, doses iniciais de concentrado, cirurgias, frequência de infusões antes do desenvolvimento de inibidor e infecções associadas) influenciam a suscetibilidade dos pacientes a desenvolver inibidores [3]. O tipo de mutação no gene do fator VIII parece contribuir consideravelmente para o risco [8], sendo as inversões dos introns 1 e 22 em pacientes graves as mais associadas com o quadro. Estudos também encontram associação entre o genótipo do antígeno leucocitário humano (HLA) de classe II do paciente e polimorfismos em genes de citocinas com o desenvolvimento de inibidores [9-11]. Outros genes envolvidos na regulação do sistema imune também podem interferir na formação dos inibidores.

O HLA-G, cuja expressão foi descrita inicialmente no citotrofoblasto durante a gravidez, pertence à família das moléculas do HLA de classe Ib não-clássicas [12]. O *splicing* alternativo do transcrito primário do gene do HLA-G gera isoformas de proteína solúveis (HLA-G5 a HLA-G7) e ligadas à membrana (HLA-G1 a HLA-G4) [13]. Tanto o HLA-G solúvel no plasma como o ligado a membrana funciona como um múltiplo imunorregulador, com importante função imunossupressora e possível indução de imunotolerância [14], através da inibição de células NK e linfócitos T citotóxicos, inibição da proliferação de células T CD4+ e liberação de citocinas, geração de novos tipos de células regulatórias T CD4+ e T CD8+ através da transferência da membrana contendo o HLA-G das células apresentadoras de antígenos para células T ativadas (troglitose) e inibição da diferenciação de células dendríticas. Muitos estudos associam a menor expressão de HLA-G solúvel com rejeição a transplantes, câncer, doenças inflamatórias e autoimunes [15]. Um polimorfismo de inserção/deleção de 14pb (rs1704) [16] localizado na região 3' não traduzida do gene parece ter um importante papel no *splicing* alternativo e foi associado com diferentes níveis de HLA-G solúvel no plasma [17]. Outro polimorfismo localizado nessa região, na posição +3142 (rs1063320), parece alterar a ligação de microRNAs, influenciando, assim, a expressão de HLA-G solúvel [18].

A proteína tirosina fosfatase não receptora tipo 22 (PTPN22), também conhecida como Lyp, é fundamental para a manutenção do equilíbrio da resposta imune [19,20]. Ela regula a sinalização através do receptor de células T, atenuando a ativação das mesmas. Um polimorfismo no éxon 14 do gene PTPN22, C1858T (rs2476601), foi associado com o desenvolvimento de doenças inflamatórias [21].

O objetivo deste estudo é investigar se os polimorfismos no gene do HLA-G (inserção/deleção de 14pb e SNP +3142C/G) e no gene PTPN22 (SNP C1858T) podem conferir suscetibilidade ao desenvolvimento de inibidores em pacientes com hemofilia A grave.

Materiais e métodos

Pacientes e amostras

A amostra de estudo inclui 171 pacientes hemofílicos A graves, sendo que setenta e três possuem a inversão do intron 22 e sete possuem a inversão do intron 1

[22]. Os pacientes são provenientes do Laboratório de Hemostasia do Departamento de Genética da UFRGS e do HEMOCENTRO-RS. Todos os participantes são eurodescendentes e foram testados para a presença de inibidor após o tratamento. A presença e a quantificação de inibidores anti FVIII foi feita pelo método Bethesda modificado [23]. O DNA genômico dos pacientes foi extraído de amostras de sangue periférico por método não enzimático conforme descrito por Lahiri & Nurnberger [24]. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e todos os pacientes ou seus representantes legais assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Análise genética

Para genotipagem do polimorfismo da inserção/deleção de 14pb, foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR) com o DNA genômico obtido. Os produtos de PCR amplificados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta. O alelo com a inserção de 14pb gera um fragmento de 224pb, enquanto o alelo com a deleção gera um fragmento de 210pb. O polimorfismo +3142 C>G foi genotipado por PCR/RFLP, utilizando a enzima de restrição *BaeGI*. Os produtos gerados pela clivagem foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta. O alelo C gera um fragmento intacto de 406pb, enquanto o alelo G gera fragmento de 316 e outro de 90pb. Os primers e as condições de PCR utilizadas para genotipagem dos dois polimorfismos são os mesmos descritos por Cordero *et al.* [25]. Para genotipagem do polimorfismo C1858T no gene PTPN22, um fragmento de 218pb que contém essa região foi amplificado segundo condições especificadas por Zheng & She [26]. Os produtos amplificados foram digeridos com 5 unidades de *RsaI*, e os produtos gerados analisados em eletroforese em gel de poliacrilamida 6%. O alelo mutante 1858T não pode ser digerido e resulta em um fragmento de 218pb, enquanto o alelo 1858C resulta em um fragmento de 176pb e um de 46pb.

Testes estatísticos

O teste de qui-quadrado foi utilizado para comparar as frequências alélicas dos polimorfismos estudados entre pacientes com e sem inibidores. Análises de regressão logística uni e multivariadas foram empregadas para estimar o risco de

desenvolvimento de inibidores. Os programas utilizados para cálculos foram o SPSS 18 e o BioEstat 5.0.

O programa MLocus foi utilizado para análise de desequilíbrio de ligação, análise de haplótipos e diplótipos para os polimorfismos no gene do HLA-G.

Resultados

Entre os pacientes estudados, cinquenta e um desenvolveram inibidores, sendo que apenas seis apresentaram altos títulos ($>5\text{UB ml}^{-1}$). Tanto o grupo de pacientes com inibidor como o grupo sem inibidor apresentou distribuição genotípica consistente com a predita pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, para os três polimorfismos analisados. A tabela 1 mostra a distribuição genotípica e as frequências alélicas obtidas para os polimorfismos HLA-G Ins/Del 14pb, HLA-G +3142C/G e PTPN22 C1858T. A frequência do alelo da inserção de 14pb foi um pouco maior entre os indivíduos com inibidor, mas não atingiu significância estatística (Ins = 0,47 vs. 0,40; $p = 0,449$). Analisando o SNP HLA-G +3142C/G, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre a distribuição alélica e genotípica de cada um dos grupos. Do mesmo modo, as frequências observadas para o polimorfismo PTPN22 C1858T não diferem significativamente entre pacientes com inibidores e sem inibidores. O genótipo T/T não foi observado em nossa população de estudo.

Considerando somente os pacientes que possuem as inversões dos introns 1 e 22 ($n = 80$), os polimorfismos HLA-G Ins/Del 14pb ($p = 0,642$), HLA-G +3142C/G ($p = 0,692$) e PTPN22 C1858T ($p = 0,659$) também não influenciaram o desenvolvimento de inibidores. Ainda, não houve interação entre qualquer dos polimorfismos estudados e a presença de inversões no desenvolvimento de inibidores.

Na análise multivariada, controlando-se para a presença das inversões, nenhum dos polimorfismos foi considerado fator de risco para o desenvolvimento de inibidores. A presença do alelo da inserção no polimorfismo HLA-G $\pm 14\text{pb}$ (modelo dominante) também não é fator de risco ($p = 0,641$), assim como a presença do alelo G no polimorfismo HLA-G +3142C/G ($p = 0,196$). Também não foi encontrada associação entre o risco de desenvolvimento de inibidores e o alelo da inserção de 14pb em homozigose (modelo recessivo, $p = 0,177$) e o alelo G em homozigose ($p = 0,807$).

Tabela 1. Distribuição dos polimorfismos em pacientes hemofílicos A graves com e sem inibidores.

Genótipo/Alelo	Inibidor positivo	Inibidor negativo	<i>p</i> *
HLA-G Ins/Del 14pb	(N=51)	(N=120)	
+14pb/+14pb	0, 216 (11)	0, 167 (20)	0, 442
+14pb/-14pb	0, 510 (26)	0, 458 (55)	
-14pb/-14pb	0, 274 (14)	0, 375 (45)	
Alelo inserção	0, 470 (48)	0, 400 (95)	0, 449
Alelo deleção	0, 530 (54)	0, 600 (145)	
HLA-G +3142C/G			
CC	0,137 (7)	0, 217 (26)	0, 474
CG	0, 530 (27)	0, 467 (56)	
GG	0, 333 (17)	0, 316 (38)	
Alelo C	0, 400 (41)	0, 450 (108)	0, 475
Alelo G	0, 600 (61)	0, 550 (132)	
PTPN22 C1858T (Arg620Trp)			
CC	0, 765 (39)	0, 750 (90)	0, 991
CT	0, 235 (12)	0, 250 (30)	
TT	0	0	
Alelo C	0, 880 (90)	0, 880 (210)	0, 838
Alelo T	0, 120 (12)	0, 120 (30)	

N = número de indivíduos.

* χ^2

Os polimorfismos HLA-G $\pm 14\text{pb}$ e HLA-G +3142C/G encontram-se em desequilíbrio de ligação parcial, com valor de $D' = 0,660$. A frequência dos possíveis haplótipos apresentados pelos grupos com e sem inibidores para esses polimorfismos é apresentada na tabela 2. Não houve indicação de associação entre os haplótipos encontrados e o desenvolvimento de inibidores ($p = 0,353$). Dentre os quatro haplótipos observados, o haplótipo H1 parece ser mais frequente em pacientes com inibidores. Entretanto, a análise multivariada revelou que ele não é fator de risco para desenvolvimento de anticorpos contra o FVIII ($p = 0,093$).

A tabela 3 mostra os diplótipos encontrados para os dois grupos de pacientes, para os mesmos polimorfismos no gene do HLA-G. Novamente, não foram obtidos resultados estatisticamente significativos na comparação dos diplótipos entre os dois grupos, indicando a ausência de associação dos mesmos com o desenvolvimento de inibidores.

Tabela 2. Frequências dos haplótipos encontrados em pacientes com e sem inibidores, para os polimorfismos no gene do HLA-G.

Haplótipos	Alelos		Inibidor positivo (N)	Inibidor negativo (N)	p^*
	$\pm 14\text{pb}$	+3142C/G			
H1	Ins	G	0,450 (46)	0,350 (84)	
H2	Ins	C	0,020 (2)	0,046 (11)	0,353
H3	Del	G	0,140 (14)	0,200 (48)	
H4	Del	C	0,390 (40)	0,404 (97)	

N = número de indivíduos

* χ^2

Tabela 3. Frequências dos diplótipos encontrados em pacientes com e sem inibidores, para os polimorfismos no gene do HLA-G.

Diplótipo ^a	Inibidor positivo (N)	Inibidor negativo (N)	<i>p</i> *
H1H1	0,180 (9)	0,100 (12)	
H1H2	0,020 (1)	0,040 (5)	
H1H3	0,100 (5)	0,130 (16)	
H1H4	0,430 (22)	0,330 (39)	0,442
H2H2	0	0,030 (3)	
H2H4	0,020 (1)	0	
H3H3	0,040 (2)	0,080 (10)	
H3H4	0,100 (5)	0,100 (12)	
H4H4	0,110 (6)	0,190 (23)	

^a Os possíveis diplótipos não citados apresentam frequência igual a zero

N = número de indivíduos

* χ^2

Discussão e conclusão

As doenças hemorrágicas são patologias graves que causam grande comprometimento na qualidade de vida dos pacientes acometidos. O esclarecimento dos mecanismos que envolvem tais doenças é muito importante para que se possam buscar formas de prevenção, alívio dos sintomas ou tratamentos mais eficientes. A capacidade de prever quais pacientes hemofílicos possuem risco de desenvolver inibidores pode permitir que seja iniciada precocemente uma terapia de imunotolerância ou imunossupressão naqueles com maior risco, diminuindo a chance de formação dos anticorpos anti FVIII.

A capacidade de montar uma resposta imunológica contra o FVIII depende da presença de linfócitos B e T específicos, além de moléculas do MHC de classe II que o apresentem. Estudos genéticos em pacientes com inibidores devem considerar as duas áreas de grande variação: a mutação que causou a doença e o genótipo de moléculas do seu sistema imunológico. A incidência de inibidores deve ser menor em pacientes cuja mutação do FVIII ainda permite que certa quantidade de antígeno de FVIII esteja presente na circulação [3]. Os defeitos mais comuns que ocorrem no gene do FVIII são as inversões dos introns 1 e 22, que ocorrem em 2-5% e 30-50% dos pacientes graves, respectivamente [27,28]. A presença de inversões do gene do

FVIII provoca ausência da proteína do FVIII no plasma, e não é o fator que mais predispõe ao desenvolvimento de inibidores; entretanto, maior número de pacientes com hemofilia A grave e inversões do gene desenvolvem inibidores, comparando com pacientes graves sem as inversões [29]. Apesar disso, em nossa população de estudo, as inversões não foram consideradas fatores de risco para o desenvolvimento de inibidores [22].

O genótipo do MHC do paciente também proporciona uma variação individual na suscetibilidade ao desenvolvimento de inibidores. Esse genótipo determina se peptídeos derivados do FVIII vão ser apresentados para as células T, iniciando a resposta imunológica. Em estudos realizados com pacientes hemofílicos A e com a inversão do intron 22, alelos da classe MHC I A3, B7 e C7 e alelos da classe MHC II DQA0102, DQB0602 e DR15 foram mais frequentemente encontrados em pacientes com inibidor [9,10]. Polimorfismos em genes de citocinas ou seus receptores também podem causar um desequilíbrio da resposta imune. Polimorfismos em genes como CTLA-4, IL-4, IL-5, IL-10, IL-6 e TNF- α foram analisados em alguns estudos para verificar sua relação com desenvolvimento de inibidores. Uma forte ligação entre polimorfismos no gene do TNF- α e da IL-10 e o desenvolvimento de inibidor em irmãos hemofílicos foi encontrada [11,30].

Muitos pacientes com mutações de alto risco e genótipos desfavoráveis não desenvolvem inibidores, e a razão para esse fato não é clara [31]. Provavelmente isso ocorre porque eles não reconhecem o FVIII como estranho ou porque o genótipo do MHC, e até mesmo de outros genes que influenciam a resposta imune não permitam que tal resposta inicie [32]. Neste estudo, abordamos o papel do MHC não clássico (HLA-G) e de uma glicoproteína tirosina fosfatase na formação de inibidores em pacientes hemofílicos do sul do Brasil.

A estrutura do gene do HLA-G é idêntica ao do MHC classe I, mas difere pela sua diversidade genética, expressão e funções. O HLA-G exibe baixo nível de polimorfismos com apenas 36 alelos e 14 proteínas descritas [33]. Tanto a isoforma solúvel como a ligada à membrana funciona como um múltiplo imunossupressor [14]. As moléculas de HLA-G solúvel interferem tanto na resposta imune inata como na adaptativa, e constituem um alvo interessante a ser avaliado no desenvolvimento de inibidores. Está bem demonstrado que a formação dos inibidores contra o FVIII depende dos linfócitos T, através da ativação de células T CD4+, bem como de linfócitos B e de citocinas produzidas. Dessa forma, tendo em vista que o HLA-G

solúvel exerce modulação da atividade desses linfócitos, polimorfismos no gene da molécula podem ter implicação no desenvolvimento de inibidores no tratamento da hemofilia A. Os polimorfismos no gene do HLA-G têm sido associados com várias desordens. Entre elas o aborto espontâneo recorrente, preeclampsia, doenças inflamatórias e cutâneas, doenças autoimunes e alérgicas, tumores e rejeição de transplantes [34].

Apesar da reduzida variabilidade observada na região codificadora do locus HLA-G, a região 3' não traduzida apresenta sítios de variação potencialmente associados com a magnitude da expressão de HLA-G [34]. Essa região oferece uma diversidade de sequências de regulação pós transcricional, onde, depois da transcrição, um ou mais microRNAs (miRNA) se ligam a sítios regulatórios e reprimem a expressão da proteína por desestabilização do transcrito, repressão da tradução ou ambos [35]. MicroRNAs são implicados em um grande número de processos biológicos, e alterações genéticas relacionadas à eles provavelmente são responsáveis por mais doenças humanas do que se imagina até então. Há estudos que afirmam que miRNAs têm preferência por ligação a alelos específicos da região 3' não traduzida do locus HLA-G [18]. Assim, o estudo dessa região é importante para identificar sítios potenciais envolvidos em variações fenotípicas e doenças.

O polimorfismo de inserção/deleção de 14pb na região 3' não traduzida já foi associado com a suscetibilidade a algumas doenças inflamatórias e autoimunes [25]. Estudos prévios indicam que os níveis de HLA-G solúvel (HLA-Gs) são maiores para indivíduos que são homocigotos para a deleção de 14pb [17]. Alelos do HLA-G que apresentam a sequência de 14pb têm sido associados com uma menor produção de mRNA e níveis mais baixos de expressão de HLA-Gs. Assim, se pode hipotetizar que miRNAs que se ligam especificamente a essa região possam ser responsáveis pela menor produção de HLA-G [34]. Outros estudos confirmam que no genótipo +14pb/+14pb o nível de HLA-G solúvel é muito mais baixo que nos genótipos +14pb/-14pb e -14pb/-14pb, enquanto nenhuma diferença foi observada entre os dois últimos genótipos [17]. Níveis séricos de HLA-G estão aumentados significativamente em mulheres grávidas, e pacientes com altos níveis de HLA-Gs após um transplante têm menor incidência de episódios de rejeição [36]. Rizzo *et al.* encontraram uma frequência aumentada de +14pb/+14pb e uma frequência diminuída de -14pb/-14pb em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico [37]. O SNP localizado na posição +3142 parece alterar a ligação de miRNAs ao transcrito

do HLA-G, influenciando assim na estrutura do RNA e a repressão da tradução mediada por miRNA. Esse polimorfismo é caracterizado pela troca de uma citosina por uma guanina, e pode propiciar a ligação de miRNAs específicos. Estudos *in silico* e funcionais mostram que a presença de uma guanina na posição +3142 aumenta a afinidade dos miRNAs hsa-miR-148a, hsa-miR-148b e hsa-miR-152 ao mRNA do HLA-G, diminuindo a sua expressão [18]. Esse polimorfismo também foi associado com o desenvolvimento de doenças inflamatórias [34,25]. Apesar da expressão de HLA-G estar associada com essas diversas situações, nosso estudo não encontrou diferenças significativas entre pacientes com inibidores e sem inibidores para os dois polimorfismos testados. Nem mesmo os possíveis haplótipos e diplótipos apresentados tiveram relação com a formação de inibidores. Não há estudos prévios que correlacionem a expressão do HLA-G com o desenvolvimento de inibidores no tratamento de pacientes hemofílicos A graves.

PTPN22 atua na regulação da sinalização do receptor de células T (TCR), atenuando a resposta imune. Stanford *et al.* [21] relatam a associação entre o polimorfismo C1858T no éxon 14 do gene PTPN22 e diabetes tipo 1, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico e doença de Graves, em 2004. Outros relatos encontraram associação entre esse polimorfismo e a doença de Addison, vitiligo, *miastenia gravis* e esclerose sistêmica. Em um estudo prévio de nosso grupo, encontrou-se associação entre esse polimorfismo e o desenvolvimento de diabetes tipo 1 [38]. A substituição de um nucleotídeo C por T na posição 1858 leva a mudança de aminoácido na proteína, no códon 620, de arginina para triptofano (R620W), interrompendo o sítio de ligação da Lyp [39]. Com isso, a presença do alelo 1858T pode levar a respostas patogênicas dependentes de células T, ou hiperreatividade. Na análise desse polimorfismo em pacientes hemofílicos A graves com e sem inibidores não foi observada uma diferença significativa que o associasse com o desenvolvimento de inibidores. Esse resultado é consistente com o observado em um estudo prévio realizado em uma população de europeus [32].

Enfim, nossos resultados indicam que os polimorfismos investigados não são fatores de risco para o desenvolvimento de inibidores, em nossa população de estudo. A formação dos anticorpos anti FVIII é um processo multifatorial, e fatores não-genéticos também podem estar envolvidos. Outros estudos são necessários para melhor compreensão dos fatores de risco imunológicos, genéticos e ambientais que influenciam a patogênese do desenvolvimento de inibidores. A imunogenicidade do

FVIII é intrigante, e desvendar o mecanismo dessa resposta imune seria um grande passo para o desenvolvimento de formas de diagnóstico e terapias mais adequadas para o tratamento de pacientes com hemofilia A.

Referências

- 1 Kazazian HH Jr, Tuddenham EGD & Antonarakis SE. Hemophilia A parahemophilia: deficiencies of coagulation factors VIII and V. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. Seventh Edition. NY: McGraw Hill, Chapter 106, 1995:3241-67.
- 2 White GC II, Rosendaal F, Aledort LM, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J. Factor VIII and Factor IX Subcommittee. Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *ThrombHaemost* 2001; **85**:560.
- 3 Zhang HA, Skupsky J & Scott WD. Factor VIII Inhibitors: Risk Factors and methods for Prevention and Immune Modulation. *Allerg Immunol* 2009; **37**:114-124
- 4 Addiego J, Kasper CK, Abildgaard C *et al*. Frequency of inhibitor development in haemophilics treated with low-purity factor VIII. *Lancet* 1993; **342**:462-4.
- 5 Scandella D, Marttingly M & Prescott R. A recombinant factor VIII domain polypeptide quantitatively neutralizes human inhibitor antibodies that bind to A2. *Blood* 1993; **82**:1767-1775.
- 6 Lusher JM, Arkin S, Abildgaard CF & Schwartz RS. Recombinant factor VIII for the treatment of previously untreated patients with haemophilia A – safety, efficacy and development of inhibitors. *N Eng J Med* 1993; **328**:453-459.
- 7 Rieger A & Roisenberg I. Prevalence of factor VIII inhibitors in patients with hemophilia A in Brazil. *Thromb Haemost* 1999; **81**:475-476.
- 8 Fakharzadeh SS & Kazazian HH Jr. Correlation between factor VIII genotype and inhibitor development in haemophilia A. *Semin Thromb Hemost* 2000; **26**:167-171.

- 9 Oldenburg J, Picard JK, Schwaab R, Brackmann HH, Tuddenham EG, Simpson E. HLA genotype of patients with severe haemophilia A due to intron 22 inversion with and without inhibitors to factor VIII. *Thromb Haemost* 1997; **77**: 238–42.
- 10 Hay CR, Ollier W, Pepper L, Cumming A, Keeney S, Goodeve AC *et al.* HLA class II profile: a weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe hemophilia A. A UKHCDO Inhibitor Working Party. *Thromb Haemost* 1997; **77**: 234–7.
- 11 Astermark J, Oldenburg J, Carlson J, Pavlova A, Kavakli K, Berntorp E & Lefvert AK. Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 2006; **108**:3739-3745.
- 12 Geraghty DE, Koller BH & Orr HT. A human histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **85**:227-231.
- 13 Carosella ED, Paul P, Moreau P & Rouas-Freiss N. HLA-G and –E: fundamental and physiopathological aspects. *Immunol Today* 2000; **21**:532.
- 14 Favier B, LeMaolt J, Rouas-Freiss N, Moreau P, Menier C & Carosella ED. Research on HLA-G: an update. *Tissue antigens* 2007; **69**:207-11.
- 15 Pistoia V, Morandi F, Wang X & Ferrone S. Soluble HLA-G: Are they clinically relevant? *Seminars in Cancer Biology* 2007; **17**:469-479.
- 16 Harrison GA, Humphrey KE, Jakobsen IB & Cooper DW. A 14bp deletion polymorphism in the HLA-G gene. *Hum Mol Genet* 1993; **2**:2200.
- 17 Chen XY, Yan WH, Lin A, Xu HH, Zhang JG & Wang XX. The 14pb deletion polymorphism in the HLA-G gene play an important role in the expression of soluble HLA-G in plasma. *Tissue Antigens* 2008; **72**:335-41.
- 18 Tan Z, randall G, Fan J *et al.* Allele-specific targeting of micro RNAs to HLA-G and risk of asthma. *Am J Hum Genet* 2007; **81**:829-34.
- 19 Begovich AB, Carlton VEH, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC *et al.* A Missense Single-Nucleotide Polymorphism in a Gene Encoding a Protein Tyrosine Phosphatase (*PTPN22*) Is Associated with Rheumatoid Arthritis *Am. J. Hum. Genet.* 2004; **75**:330-337.
- 20 Siminovitch KA. *PTPN22* e doenças autoimunes. *Nature genetics* 2004; **36**: 1248-1249.

- 21 Stanford SM, Mustelin TM & Bottini N. Lymphoid tyrosine phosphatase and autoimmunity: human genetics rediscovers tyrosine phosphatases. *Semin Immunopathol* 2010; **32**:127-136.
- 22 Leiria LB, Roisenberg I, Salzano FM & Bandinelli E. Introns 1 and 22 inversions and factor VIII inhibitors in patients with severe haemophilia A in southern Brazil. *Haemophilia* 2008; 1-5.
- 23 Kasper C, Aledort LM, Counts RB, Edson JR, Fratantoni J, Green D *et al.* A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemor* 1975; **34**:869-872.
- 24 Lahiri DK & Nurnberger J. A rapid nonenzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucl Acids Res.* 1991; **19**:5444.
- 25 Cordero EAA, Veit TD, Silva MAL, Jacques SMC, Silla LMDR & Chies JAB. HLA-G polymorphism influences the susceptibility to HCV infection in sickle cell disease patients. *Tissue Antigens* 2009; **74**: 308-313.
- 26 Zheng W & She JX. Genetic Association Between a Lymphoid Tyrosine Phosphatase (*PTPN22*) and Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2005; **54**: 906-8.
- 27 Bagnall RD, Waseem N, Green, PM & Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe haemophilia A. *Blood* 2002; **99**:168-174.
- 28 Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE & Gitschier J. Inversions disrupting the factor viii gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nature Genet* 1993; **5**:236-241.
- 29 Antonarakis SS, and a Consortium of 65 international authors. Factor VIII gene inversions in severe haemophilia A – results of an international consortium study. *Blood* 1995; **86**:2206-2212.
- 30 Astermark J. Why do inhibitors develop? Principles of and factors influencing the risk for inhibitor development in haemophilia. *Haemophilia* 2006; **12**:52-60.
- 31 Bafunno V, Santacroce R, Chetta M, D'Andrea G, Pisanelli D, Sessa F *et al.* Polymorphisms in genes involved in autoimmune disease and the risk of FVIII inhibitor development in Italian patients with haemophilia A. *Haemophilia* 2009; 1-5.

- 32 White GC, Kempton CL, Grimsley A, Nielsen B & Roberts HR. Cellular immune responses in hemophilia: Why do inhibitors develop in some, but not all hemophiliacs? *Thromb Haemost* 2005; **3**: 1676-1681.
- 33 Robinson J, Waller MJ, Parham P *et al*. IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Research* 2003; **31**:311-4.
- 34 Castelli EC, Moreau P, Chiromatzo A, Chiromatzo O, Mendes-Junior CT, Veiga-Castelli LC *et al*. *In silico* analysis of micro RNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. *Human Immunology* 2009; **70**:1020-1025.
- 35 Greener MJ, Sewry CA, Muntoni F & Roberts RG. The 3' untranslated region of the dystrophin gene – conservation and consequences of loss. *European Journal of Human Genetics* 2002; **10**:413.
- 36 Rousseau P, Discorde ML, Mouillot G, Marcou C, Carosella ED & Moreau P. The 14 bp Deletion-Insertion Polymorphism in the 3' Ut region of the HLA-G Gene Influences HLA-G mRNA Stability. *Human Immunology* 2003; **64**: 1005-1010.
- 37 Rizzo R, Hviid TV, Govoni M *et al*. HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 2008; **71**: 520–9.
- 38 Chagastelles PC, Romitti M, Trein MR, Bandinelli E, Tschiedel B & Nardi NB. Association between the 1858T allele of the protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 22 and type 1 diabetes in a Brazilian population. *Tissue Antigens* 2010.
- 39 Bottini N, Musumeci L, Alonso A *et al*. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* 2004; **36**: 337–8.

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos em nosso estudo indicam que os polimorfismos investigados não são fatores de risco para o desenvolvimento de inibidores, e sugerem ausência de associação entre os polimorfismos na região 3' não traduzida do gene do HLA-G e do polimorfismo C1858T em PTPN22 com o desenvolvimento de inibidores em hemofílicos A graves do sul do Brasil. Este foi o primeiro estudo a analisar os polimorfismos no gene do HLA-G em hemofílicos A com e sem inibidores. É possível que outras variantes genéticas nos genes estudados possam estar envolvidas no desenvolvimento de inibidores. Ainda, devido à grande diversidade das moléculas do HLA em humanos, é difícil encontrar correlações em amostras tão pequenas como a de hemofílicos.

A formação de inibidores anti FVIII é uma característica multifatorial e a identificação dos fatores de risco para sua ocorrência é fundamental para oferecer cuidados adequados aos afetados, revertendo ou prevenindo a sua formação, já que afetam o custo, mortalidade e morbidade de um paciente. Outros estudos que envolvam os fatores de risco imunológicos, genéticos e ambientais são necessários para melhor compreensão da patogênese da formação de inibidores.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addiego J, Kasper CK, Abildgaard C *et al.* (1993) Frequency of inhibitor development in haemophiliacs treated with low-purity factor VIII. *Lancet* 342:462-4.
- Alexandre CO & Roisenberg I (1985) A genetic and demographic study of hemophilia A in Brazil. *Hum Hered* 35:250-254.
- Aly, AM. & Hoyer, LW (1992) Factor VIII-East Hartford (arginine1689 to cysteine) has procoagulant activity when separated from von Willebrand factor. *J. Clin. Invest.* 89:1382-1387.
- Aly A M, Higuchi M, Kasper,CK, Kazazian HH, Antonarakis SE, Hoyer LW (1992) Hemophilia A due to mutations that create new N-glycosylation sites. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89: 4933-4937.
- Alvarez M, Piedade J, Balsiero S, Ribas G & Regateiro F (2009) HLA-G 3' UTR SNP and 14-pb deletion polymorphisms in Portuguese and Guinea-Bissau populations. *International Journal of immunogenetics* 36:361-366.
- André S, Meslier Y, Dimitrov JD, Repessé Y, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S, Dasgupta S (2009) A Cellular Viewpoint of Anti-FVIII Immune Response in Haemophilia A. *Allerg Immunol* 37:105-113.
- Antonarakis SS, and a Consortium of 65 international authors (1995) Factor VIII gene inversions in severe haemophilia A – results of an international consortium study. *Blood* 86:2206-2212.
- Astermark J, Berntorp E, White GC, Kroner BL, MIBS Study Group. The Malmo' International Brother Study (MIBS) (2001). Further support for genetic predisposition to inhibitor development in hemophilia patients. *Haemophilia* 7: 267–72.
- Astermark J, Oldenburg J, Escobar M, White GC 2nd, Berntorp E, Malmo International Brother Study group (MIBS) (2005) Genetic defects and inhibitor development in siblings with severe hemophilia A. *Haematologica* 90: 924–31.
- Astermark J, Oldenburg J, Carlson J, Pavlova A, Kavakli K, Berntorp E & Lefvert AK (2006) Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 108:3739-3745.
- Astermark J (2006a) Basic aspects of inhibitors to factors VIII and IX and the influence of non-genetic risk factors. *Haemophilia* 12: 8-14.

- Astermark J (2006b) Why do inhibitors develop? Principles of and factors influencing the risk for inhibitor development in haemophilia. *Haemophilia* 12:52-60.
- Attwood T n & Parry-Smith DJ (2001) *Introduction to Bioinformatics*, 2nd edn. Pearson Education, Leeds, UK.
- Bafunno V, Santacroce R, Chetta M, D'Andrea G, Pisanelli D, Sessa F *et al.* (2009) Polymorphisms in genes involved in autoimmune disease and the risk of FVIII inhibitor development in Italian patients with haemophilia A. *Haemophilia* 1-5.
- Bagnall RD, Waseem N, Green, PM & Giannelli F (2002) Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe haemophilia A. *Blood* 99:168-174.
- Bahri R, Hirsch F, Josse A, Rouas-Freiss N, Bidere N, Vasquez A, *et al.* (2006) Soluble HLA-G inhibits cell cycle progression in human alloreactive T lymphocytes. *J Immunol* 176:1331–9.
- Bainbridge DR, Ellis SA & Sargent IL (2000) HLA-G suppresses proliferation of CD4(+) T-lymphocytes. *J Reprod Immunol* 48:17–26.
- Bartel, D.P. & Chen, C.Z. (2004) Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat.Rev. Genet.* 5, 396–400.
- Bottini N, Musumeci L, Alonso A *et al.* (2004) A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* 36: 337–8.
- Broze GJ (1995) Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. *Ann Rev Med* 46:103-112.
- Brower C & Thompson AR (2010) Hemophilia A. NCBI GeneReviews, University of Washington, Seattle. Acesso em Maio 2010.
- Carosella ED, Paul P, Moreau P & Rouas-Freiss N (2000) HLA-G and –E: fundamental and physiopathological aspects. *Immunol Today* 21:532.
- Carosella ED, Moreau P, Lemaoult J, Rouas-Freiss N (2008) HLA-G: From biology to clinical benefits. *Trends Immunol* 29:125–32.
- Castelli EC, Moreau P, Chiromatzo A, Chiromatzo O, Mendes-Junior CT, Veiga-Castelli LC *et al.* (2009) *In silico* analysis of micro RNAs tergeting the *HLA-G* 3' untranslated region alleles and haplotypes. *Human Immunology* 70:1020-1025.
- Chagastelles PC, Romitti M, Trein MR, Bandinelli E, Tschiedel B & Nardi NB (2010) Association between the 1858T allele of the protein tyrosine phosphatase

nonreceptor type 22 and type 1 diabetes in a Brazilian population. *Tissue Antigens* .

- Chen XY, Yan WH, Lin A, Xu HH, Zhang JG & Wang XX (2008) The 14pb deletion polymorphism in the HLA-G gene play an important role in the expression of soluble HLA-G in plasma. *Tissue Antigens* 72:335-41.
- Clements JL, Boerth NJ, Lee JR, et al. (1999) Integration of T cell receptor-dependent signaling pathways by adapter proteins. *Annu Rev Immunol* 17:89.
- Cohen S, Dadi H, Shaoul E, Sharfe N, Roifman CM (1999) Cloning and characterization of a lymphoid-specific, inducible human protein tyrosine phosphatase, Lyp. *Blood* 93: 2013–2024.
- Collen D (1999) The plasminogen (fibrinolytic) system. *Thromb haemost* 82:259-70.
- Cordero EAA, Veit TD, Silva MAL, Jacques SMC, Silla LMDR & Chies JAB (2009) HLA-G polymorphism influences the susceptibility to HCV infection in sickle cell disease patients. *Tissue Antigens* 74: 308-313.
- Dasgupta S, Navarrete AM, Delignat S, Wootla B, Andre S et al. (2007) Immune response against therapeutic factor viii in hemophilia A patients – a survey of probable risks factors. *Immunology Letters* 110:23-28.
- Davie EW & Ratnoff OD (1964) Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 145: 1310-1312.
- Dimichele DM (2006) Immune tolerance: critical issues of factor dose, purity and treatment complications. *Haemophilia* 12 (Suppl. 6):81-86.
- Fakharzadeh SS & Kazazian HH Jr (2000) Correlation between factor VIII genotype and inhibitor development in haemophilia A. *Semin Thromb Hemost* 26:167-171.
- Fay PJ, Haidaris PJ & Smudzin TM (1991) Human factor VIIIa subunit structure. Reconstruction of factor VIIIa from the isolated A1/A3-C1-C2 dimer and A2 subunit. *J Biol Chem* 14:8957-8962.
- Favier B, LeMaolt J, Rouas-Freiss N, Moreau P, Menier C & Carosella ED (2007) Research on HLA-G: an update. *Tissue antigens* 69:207-11.
- Foster PA, Fulcher CA, Houghten RA et al (1990) Synthetic factor VIII peptides with amino acid sequences contained within the C2 domain of factor VIII inhibit factor VIII binding to phosphatidylserine. *Blood* 75(10):1999–2004.
- Fulcher CA, de Graaf Mahoney S & Zimmerman TS (1987) FVIII inhibitor IgG subclass and FVIII polypeptide specificity determined by immunoblotting. *Blood* 69: 1475-80.

- Geraghty DE, Koller BH & Orr HT (1987) A human histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:227-231.
- Ghosh K & Shetty S (2009) Immune Response to FVIII in Hemophilia A: Na Overview of Risk Factors. *Allerg Immunol* 37:58-66.
- Gitscheir J, Wood WI & Goralka TM (1984) Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 312:326-330.
- Goudemand J, Rothschild C, Demiguel Vet al (2006) Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. *Blood* 107:46–51.
- Greener MJ, Sewry CA, Muntoni F & Roberts RG (2002) The 3' untranslated region of the dystrophin gene – conservation and consequences of loss. *European Journal of Human Genetics* 10:413.
- Hay CR, Ollier W, Pepper L, Cumming A, Keeney S, Goodeve AC, Colvin BT, Hill FG, Preston FE, Peake IR (1997) HLA class II profile: a weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe hemophilia A. A UKHCDO Inhibitor Working Party. *Thromb Haemost* 77: 234–7.
- Hamsters - The Haemophilia A Mutation, Structure, Test And Resource Site, <http://Europium.Csc.Mrc.Ac.Uk/Webpages/Main/Main.htm> (Acesso em 23 de Junho de 2010).
- Harrison GA, Humphrey KE, Jakobsen IB & Cooper DW (1993) A 14bp deletion polymorphism in the HLA-G gene. *Hum Mol Genet* 2:2200.
- Hoffman M & Monroe DM (2001) A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 85:958-65.
- Hoffman M (2003) Remodeling the blood coagulation cascade. *J Thromb Thrombolysis* 16:17-20.
- Jacquemin MG & Saint-Remy JM (1998) Factor VIII immunogenicity. *Haemophilia* 4:552-557.
- Kanai T, Fujii T, Kozuma S, Yamashita T, Miki A, Kikuchi A, *et al.* (2001) Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture. *Mol Hum Reprod* 7:195–200.
- Kane WH & Davie EW (1988) Blood coagulation factors V and VIII: structural and functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders. *Blood* 71: 539–55.

- Kasper C, Aledort LM, Counts RB, Edson JR, Fratantoni J, Green D *et al.* (1975) A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemor* 34:869-872.
- Kazazian HH Jr, Tuddenham EGD & Antonarakis SE (1995) Hemophilia A parahemophilia: deficiencies of coagulation factors VIII and V. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. Seventh Edition. NY: McGraw Hill, Chapter 106, 3241-67.
- Kempton CL & White GC (2009) How we treat a hemophilia A patient with factor VIII inhibitor. *Blood* 113:11-17.
- Lahiri DK & Nurnberger J (1991) A rapid nonenzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucl Acids Res.* 19:5444.
- Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE & Gitschier J (1993) Inversions disrupting the factor viii gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nature Genet* 5:236-241.
- Lavigne-Lissalde G, Rothschild C, Pouplard C, Lapalud P, Gruel Y, Schved JF & Granier C (2009) Characteristics, Mechanisms of Action, and Epitope Mapping of Anti-factor VIII Antibodies. *Allerg Immunol* 37:67-79.
- Le Gal FA, Riteau B, Sedlik C, Khalil-Daher I, Menier C, Dausset J, *et al.* (1999) HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* 11:1351-6.
- Leiria LB, Roisenberg I, Salzano FM & Bandinelli E (2008) Introns 1 and 22 inversions and factor VIII inhibitors in patients with severe haemophilia A in southern Brazil. *Haemophilia* 1-5.
- LeMaoult J, Caumartin J, Daouya M, Favier B, Le Rond S, Gonzalez A, *et al.* (2007) Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells. *Blood* 109:2040-8.
- Lillicrap D, Vandendriessche T & High K (2006) Cellular and genetic therapies for haemophilia. *Haemophilia* 12:36-41.
- Lorenzo JI, Lopez A, Altisent C, Aznar JA (2001) Incidence of factor VIII inhibitors in severe haemophilia: the importance of patient age. *Br J Haematol* 113:600-3.
- Lusher JM, Arkin S, Abildgaard CF & Schwartz RS (1993) Recombinant factor VIII for the treatment of previously untreated patients with haemophilia A – safety, efficacy and development of inhibitors. *N Eng J Med* 328:453-459.

- Macfarlane RG (1964) An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 202: 498-499.
- Marcus, AJ & Safier LB (1993) Thromboregulation multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *Faseb Journal* 7:516-522.
- Mariani G & Kroner B for the Immune Tolerance Study Group (ITSG). Immune tolerance in hemophilia with factor VIII inhibitors: predictors of success. *Haematologica* 86:1186-93.
- Mustelin T, Brockdorff J, Rudbeck L, *et al.* (1999) The next wave: protein tyrosine phosphatases enter T cell antigen receptor signalling. *Cell Signal* 11:637.
- National Center for Biotechnology Information – Single Nucleotide Polymorphism (NCBI – SNP), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html> (Acesso em 27 de Maio de 2010).
- Oldenburg J, Picard JK, Schwaab R, Brackmann HH, Tuddenham EG, Simpson E (1997) HLA genotype of patients with severe haemophilia A due to intron 22 inversion with and without inhibitors to factor VIII. *Thromb Haemost* 77: 238–42.
- Peyvandi F, Jayandharan G, Chandy MA, Srivastava A, Nakaya SM, Johnson MJ, Thompson AR, Goodeve A, Garagiola I & Lavoretano S (2006) Genetic diagnosis of haemophilia and other inherited bleeding disorders. *Haemophilia* 12:82–89.
- Pistoia V, Morandi F, Wang X & Ferrone S (2007) Soluble HLA-G: Are they clinically relevant? *Seminars in Cancer Biology* 17:469-479.
- Rammensee H-G, Friede T & Stevanovic S (1995) MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41: 178-228.
- Reding MT, Wu H, Krampf m ET AL (2000) Sensitization of CD4+ T cells to coagulation factor VIII: response in congenital and acquired hemophilia patients and in healthy subjects. *Thromb Haemost* 84:643-52.
- Reding MT, Lei S, Lei H, Green D, Gill J, Conti-Fine BM (2002) Distribution of Th1- and Th2-induced anti-factor VIII IgG subclasses in congenital and acquired hemophilia patients. *Thromb Haemost* 88:568–575 51.
- Rezende SM, Fujimoto DE, Daldegan MB & Thomas S (2005) Manual de tratamento das coagulopatias hereditária. 1ª ed. Ministério da Saúde. Brasília Df, 76 pp.

- Rieger A & Roisenberg I (1999) Prevalence of factor VIII inhibitors in patients with hemophilia A in Brazil. *Thromb Haemost* 81:475-476.
- Ristich V, Liang S, Zhang W, Wu J & Horuzsko A (2005) Tolerization of dendritic cells by HLA-G. *Eur J Immunol* 35:1133–42.
- Rizzo R, Hviid TV, Govoni M *et al.* (2008) HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 71: 520–9.
- Robinson J, Waller MJ, Parham P *et al.*, (2003) IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Research* 31:311-4.
- Rossetti LC, Goodeve A, Larripa IB & De Brasi CD (2004) Homeologous recombination between alusx-sequences as a cause of haemophilia. *Hum Mutat* 24:440-445.
- Rouas-Freiss N, Kirszenbaum M, Dausset J & Carosella ED (1997a) Fetomaternal tolerance: Role of HLA-G molecule in the protection of the fetus against maternal natural killer activity. *C R Acad Sci III* 320:385–92.
- Rouas-Freiss N, Marchal RE, Kirszenbaum M, Dausset J & Carosella ED (1997b) The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5249–54.
- Rousseau P, Discorde ML, Mouillot G, Marcou C, Carosella ED & Moreau P (2003) The 14 bp Deletion-Insertion Polymorphism in the 3' Ut region of the HLA-G Gene Influences HLA-G mRNA Stability. *Human Immunology* 64: 1005-1010.
- Saenko EL, Shima M, Rajalakshmi KJ *et al* (1994) A role for the C2 domain of factor VIII in binding to von Willebrand factor. *J Biol Chem* 269(15):11601–11605.
- Salviato R, Belvini D, Radossi P, Sartori R, Pierobon F, Zanotto D *et al.* (2007) F8 gene mutations profile and ITT response in a cohort of Italian haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia* 13:361-372.
- Samelson LE & Klausner RD (1992) Tyrosine kinases and tyrosinebased activation motifs. Current research on activation via the T cell antigen receptor. *J Biol Chem* 267:24913

- Scandella D, Mattingly M, de Graaf S, Fulcher CA (1989) Localization of epitopes for human factor VIII inhibitor antibodies by immunoblotting and antibody neutralization. *Blood* 74: 1618–26.
- Scandella D, Mattingly M & Prescott R (1993) A recombinant factor VIII domain polypeptide quantitatively neutralizes human inhibitor antibodies that bind to A2. *Blood* 82:1767-1775.
- Scandella D, Gilbert GE, Shima M et al (1995) Some factor VIII inhibitor antibodies recognize a common epitope corresponding to C2 domain amino acids 2248 through 2312, which overlap a phospholipid-binding site. *Blood* 86:1811–1819.
- Scandella D (1996) Human anti-factor VIII antibodies: epitope localization and inhibitory function. *Vox Sang* 70 (Suppl 1):9–14.
- Scandella D, Mondorf W, Klinge J (1998) The natural history of the immune response to exogenous factor VIII in severe haemophilia A. *Haemophilia* 4:546–551.
- Scandella D (1999) Epitope specificity and inactivation mechanisms of factor VIII inhibitor antibodies. *Vox Sang* 77(Suppl 1):17–20.
- Scharrer I, Bray GL, Neutzling O. Incidence of inhibitors in haemophilia A patients—a review of recent studies of recombinant and plasma-derived factor VIII concentrates. *Haemophilia* 1999; 5: 145–54.
- Schwaab R, Brackmann HH, Meyer C *et al.* (1995) Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. *Thromb Haemost* 74:1402-6.
- Siminovitch KA (2004) *PTPN22* e doenças autoimunes. *Nature genetics* 36: 1248-1249.
- Stanford SM, Mustelin TM & Bottini N (2010) Lymphoid tyrosine phosphatase and autoimmunity: human genetics rediscovers tyrosine phosphatases. *Semin Immunopathol* 32:127-136.
- Tan Z, Randall G, Fan J *et al.* (2007) Allele-specific targeting of micro RNAs to HLA-G and risk of asthma. *Am J Hum Genet* 81:829-34.
- Tiarks C, Pechet L, Anderson J et al (1992) Characterization of a factor VIII immunogenic site using factor VIII synthetic peptide 1687–1695 and rabbit anti-peptide antibodies. *Thromb Res* 65:301–310.
- Tuddenham EGD & Cooper DN (1994) Factor VIII and haemophilia A. *Oxford Mon Med Genet* 25:19-76.

- Tuddenham EGD & Mcvey JH (1998) The genetic basis of inhibitor development in haemophilia A. *Haemophilia* 4:543-545.
- van der Meer A, Lukassen HG, van Cranenbroek B, Weiss EH, Braat DD, van Lierop MJ, *et al.* (2007) Soluble HLA-G promotes Th1-type cytokine production by cytokine-activated uterine and peripheral natural killer cells. *Mol Hum Reprod* 13:123–33.
- van der Ven K, Pfeiffer K & Skrabin S (2000) HLA-G polymorphisms and Molecule Function-Questions and More Questions-A Review. *Trophoblast Research* 14: 86-92.
- Vang T, Congia M, Macis MD *et al.* (2005) Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat Genet* 37: 1317–9.
- Veit TD & Chies JAB (2009) Tolerance versus immune response - MicroRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. *Transplant Immunology* 20:229-231.
- White GC II, Rosendaal F, Aledort LM, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J (2001) Factor VIII and Factor IX Subcommittee. Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 85:560.
- White GC, Kempton CL, Grimsley A, Nielsen B & Roberts HR (2005) Cellular immune responses in hemophilia: Why do inhibitors develop in some, but not all hemophiliacs? *Thromb Haemost* 3: 1676-1681.
- Wilcox JN; Smith KM; Schwartz SM & Gordon D (1989) Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2839-2843.
- Zhang HA, Skupsky J & Scott WD (2009) Factor VIII Inhibitors: Risk Factors and methods for Prevention and Immune Modulation. *Allerg Immunol* 37:114-124.
- Zheng W & She JX (2005) Genetic Association Between a Lymphoid Tyrosine Phosphatase (*PTPN22*) and Type 1 Diabetes. *Diabetes* 54: 906-8.