

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**POLIMORFISMOS NO SISTEMA IMUNE E A FORMAÇÃO DE
INIBIDORES ANTI-FATOR VIII EM PACIENTES COM HEMOFILIA A
GRAVE DO RIO GRANDE DO SUL**

DAIANE AGOSTINI

**Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular da UFRGS como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Mestre**

Orientador: Francisco Mauro Salzano

Colaboradora: Eliane Bandinelli

Porto Alegre, Maio de 2011

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Hemostasia do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e foi subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

*Ao Professor Salzano,
por todo o apoio, auxílio, confiança e paciência,
imprescindíveis para a realização deste trabalho,
e por ser o melhor exemplo de profissionalismo que eu poderia ter.*

*À Professora Eliane Bandinelli,
pela amizade e pela contribuição na minha
formação acadêmica ao longo desses anos.*

*À Mariana,
pela amizade e grande auxílio nas análises estatísticas.*

*À Clévia,
pela amizade, pelo carinho e
pela disposição em me ajudar sempre que necessário.*

*Aos demais colegas do Laboratório de Hemostasia do
Departamento de Genética da UFRGS,
pelo auxílio sempre que necessário e convívio agradável.*

*Aos pacientes,
por concordarem em participar do estudo e
tornarem possível sua realização.*

*À minha mãe, Adélia,
pelo exemplo, confiança, preocupação,
amor e apoio incondicional.*

*Ao Morbini, ao Raul, à minha irmã, Monique e ao Régis,
pela compreensão, carinho e incentivo.*

*À Fernanda e à Talita,
pela amizade, pelo apoio e por tornar
meus dias mais alegres.*

*Ao Josué,
Por toda a atenção, carinho, apoio e dedicação.*

*Aos meus colegas da Biomedicina,
pelo companheirismo e amizade.*

*Aos professores do Departamento de Genética e à UFRGS,
pelo ensino de qualidade e estrutura proporcionados.*

*E a todos que de alguma forma contribuíram
para a realização desse trabalho.*

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
CAPÍTULO 1. <i>INTRODUÇÃO</i>	9
1.1. A Hemostasia.....	10
1.1.1. <i>Introdução</i>	10
1.1.2. <i>O mecanismo de coagulação sanguínea</i>	12
1.1.2.1. <i>A via clássica da cascata de coagulação</i>	12
1.1.2.2. <i>A via celular-enzimática da cascata de coagulação</i>	15
1.1.3. <i>O Fator VIII</i>	19
1.2. A Hemofilia A.....	21
1.2.1. <i>Introdução</i>	21
1.2.2. <i>As mutações no gene do Fator VIII e a hemofilia A</i>	22
1.2.3. <i>A classificação e a sintomatologia dos hemofílicos do Tipo A</i>	23
1.2.4. <i>O tratamento para pacientes com hemofilia A</i>	24
1.3. Os inibidores contra o Fator VIII.....	26
1.3.1. <i>Introdução</i>	26
1.3.2. <i>O mecanismo de formação dos inibidores</i>	28
1.3.3. <i>Os fatores de risco para a formação dos inibidores</i>	34
1.3.4. <i>O tratamento de pacientes com inibidores</i>	40
1.4. Sistemas que podem afetar a resposta imune ao Fator VIII.....	43
1.4.1. <i>IL4 e IL4R</i>	43
1.4.2. <i>IL10</i>	46

1.4.3. TNFA e TNFR1.....	49
1.4.4. Outros.....	52
1.4.4.1. HLA-G.....	53
1.4.4.2. PTPN22.....	54
1.4.4.3. HLA Classe II.....	55
1.4.4.4. CTLA-4.....	56
1.4.4.5. FOXP3.....	57
1.4.4.6. IRF5.....	58
CAPÍTULO 2. OBJETIVO.....	60
CAPÍTULO 3. ARTIGO.....	62
CAPÍTULO 4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	74
REFERÊNCIAS.....	78

RESUMO

Foi realizada inicialmente uma revisão sobre o processo de hemostasia, as características da hemofilia A, e os fatores que influem na formação de inibidores contra o Fator VIII, um dos principais problemas na terapêutica de reposição do mesmo em hemofílicos A graves. Posteriormente, visando verificar possíveis suscetibilidades genéticas no desenvolvimento de tais anticorpos, foram descritos estudos envolvendo 154 hemofílicos A graves localizados no Rio Grande do Sul, 47 com e 107 sem inibidores. A pesquisa envolveu 10 polimorfismos em cinco sistemas relacionados à resposta imune (IL4, IL4R, IL10, TNF α e TNFR1). Três desses polimorfismos (IL4R 1902A>G, TNF α -863A>C, e TNFR1 303A>G) nunca haviam sido estudados dentro desse contexto. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas prevalências desses polimorfismos entre as duas séries, em concordância com algumas, mas não todas as investigações prévias. A questão de por que alguns pacientes desenvolvem tais inibidores, mas outros não, permanece em aberto.

ABSTRACT

A review was initially made on the hemostatic process, the characteristics of hemophilia A, and the factors that influence the formation of inhibitors against Factor VIII, one of the main problems that exist in the therapeutics of its replacement in severe hemophilia A patients. Afterwards, in an attempt to verify possible genetic susceptibilities in the development of such antibodies, a description was made of studies involving 154 severe hemophilia A subjects living in Rio Grande do Sul, 47 with and 107 without inhibitors. The research included 10 polymorphisms in five systems related to the immune response (IL4, IL4R, IL10, TNF α and TNFR1). Three of them (IL4R 1902A>G, TNF α -863A>C, and TNFR1 303A>G) had never been studied in this context. No statistical significant differences were found between the two series, in agreement with some, but not all previous investigations. The question of why some, but not all severe hemophilia A patients develop anti-Factor VIII antibodies remain open.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. A Hemostasia

1.1.1. Introdução

O sangue é responsável por diversas funções importantes no organismo, as quais mantêm constantes e normais as condições internas do corpo. Entretanto, para a manutenção de todas essas funções, o sangue precisa permanecer fluido dentro do sistema circulatório. No caso de ocorrer um extravasamento de sangue dos vasos ou do sangue não permanecer líquido, surgem certas modificações que estancam o sangramento ou atuam na fluidez sanguínea. Esse conjunto de alterações fisiológicas é conhecido como hemostasia (Tuddenham & Cooper, 1994). Se qualquer uma dessas mudanças ocorrer 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 através da formação do tampão ou trombo plaquetário; a hemostasia secundária forma uma rede de fibrina (coágulo) encarregada de estabilizar o trombo. O processo hemostático envolve quatro etapas: 1. vasoconstrição no sítio de injúria vascular; 2. formação do tampão de plaquetas (adesão, ativação e agregação plaquetária);

3. ativação da cascata de coagulação sanguínea, levando à formação da rede de fibrina; e 4. dissolução da rede de fibrina.

A lesão do endotélio do vaso expõe o colágeno subendotelial às plaquetas circulantes e estimula a adesão plaquetária. Esta ligação é estabilizada pelo Fator von Willebrand (FvW), um multímero produzido normalmente pelas células do endotélio. Depois de aderidas, as plaquetas sofrem a ação de substâncias ativadoras e liberam o conteúdo de seus grânulos, o que provoca o recrutamento de outras plaquetas que adquirem 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).

De acordo com o ponto de vista clássico da coagulação, este é o evento final após duas sequências de reações principais: 1. conversão da protrombina em trombina através da ação da tromboplastina e dos íons cálcio e 2. transformação do fibrinogênio em fibrina sob a influência da trombina, sendo envolvidas várias etapas e a ativação de vários fatores de coagulação em cada uma das reações (Tuddenhan & Cooper, 1994). Esses fatores de coagulação são interdependentes para que se forme um coágulo, logo, a

deficiência de um ou mais fatores pode resultar em uma resposta hemostática anormal.

1.1.2. O Mecanismo de Coagulação Sanguínea

1.1.2.1. A Via Clássica da Cascata de Coagulação

Em 1964 foi proposta a via clássica para explicar a fisiologia da coagulação do sangue (Macfarlane e Davie & Ratnoff, 1964). Esta via compreende as cascatas de ativação das vias intrínseca e extrínseca. A via intrínseca, também chamada de via do contato mediada por superfície negativa, ou ainda via do Fator XII, tem papel na sustentação e na manutenção do processo sob sua ativação. Já a via extrínseca, ou via do fator tecidual, constitui o principal e mais rápido mecanismo que leva à geração de trombina (Opal & Esmon, 2003). Nas duas vias atuam cerca de 20 fatores plasmáticos, quase todos de natureza protéica, sendo majoritariamente 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 pequeno número, mas é capaz de ativar um número muito maior do próximo fator da cascata, e assim sucessivamente. Vários processos de retroalimentação, tanto positivos quanto negativos, regulam essa cascata de coagulação (Broze, 1995).

Na via extrínseca, a lesão do vaso faz com que as células endoteliais liberem fator tecidual (TF), também conhecido como tromboplastina. Esse 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 na interação entre o TF e o Fator VIIa. Esse complexo tenase extrínseco, por sua vez, catalisa a ativação do Fator X (Tuddenham & Cooper, 1994).

A via intrínseca, ou via do contato mediada por superfície negativa, é iniciada 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 fosfolípídeos de membrana, que ativa o Fator IX, o qual por sua vez na presença do Fator VIIIa ativa o Fator X (Tuddenham & Cooper, 1994).

Depois da ativação do Fator X, o mecanismo observado nas vias extrínseca e intrínseca é o mesmo (via comum). O Fator Xa ativa o Fator V, possibilitando a formação do complexo protrombinase. Esse complexo, que também depende de cálcio, leva à conversão da protrombina em trombina. Nesse momento, o mecanismo de amplificação da cascata da coagulação faz com que seja formada uma

grande quantidade de trombina. A trombina promove a transformação do fibrinogênio em monômeros de fibrina, que logo se combinam para formar polímeros, além de ativar o Fator XIII, que estabiliza o coágulo. O processo é finalizado com a formação de um aglomerado de plaquetas e outras células, como eritrócitos. Isso consolida o coágulo que sela a lesão e interrompe o extravasamento sanguíneo (Tuddenham & Cooper, 1994; Broze, 1995).

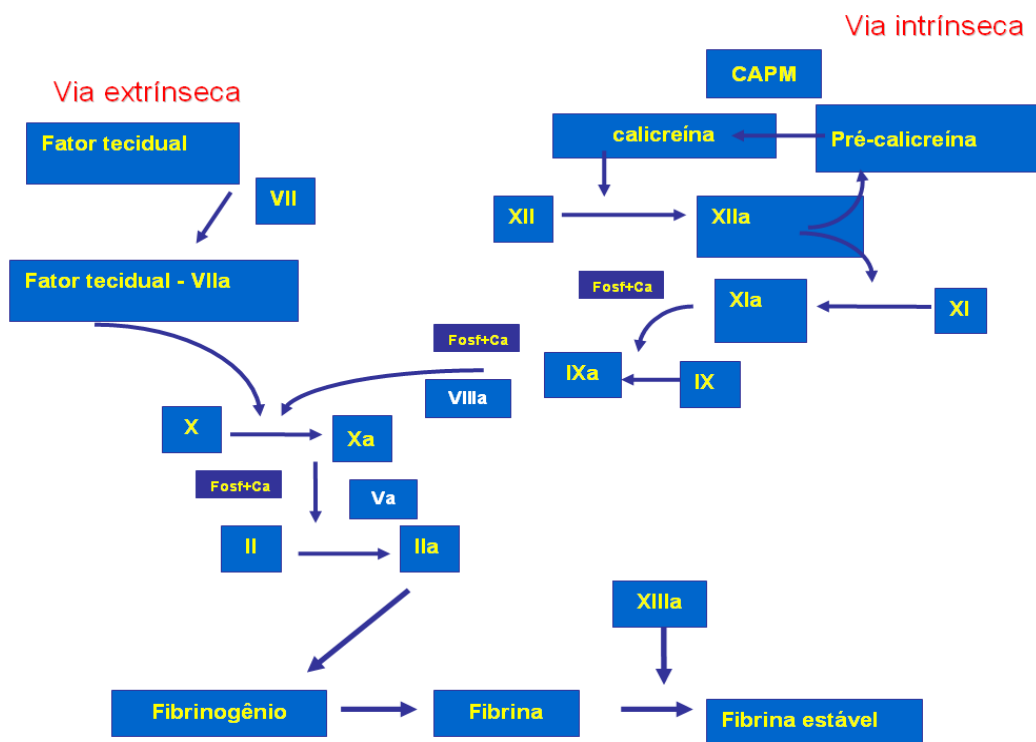


Fig.1. A via clássica da cascata da coagulação sanguínea. Representação da Via Extrínseca e Intrínseca da Coagulação. Adaptado de Tuddenham & Cooper (1994).

Atualmente, a divisão do sistema de coagulação do sangue em intrínseco e extrínseco é considerada inadequada, tendo em vista que essa divisão não ocorre *in vivo*. A utilização dos termos intrínseco e extrínseco, no entanto, ainda pode ser útil na interpretação dos exames laboratoriais utilizados para a avaliação da hemostasia.

1.1.2.2. A via celular-enzimática da cascata de coagulação

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 seria regulada apenas por fatores protéicos, sendo as células unicamente uma superfície negativa sobre a qual os complexos pró-coagulantes são montados. O modelo dá enfoque à interação entre os fatores da coagulação e superfícies celulares específicas, e se baseia numa série de três etapas: 1. Iniciação, 2. Amplificação e 3. Propagação. Essas três etapas ocorrem em diferentes tipos celulares, até a formação da rede estável de fibrina (Hoffman & Monroe, 2001; Hoffman, 2003) (Figura 2).

Normalmente o TF não é expresso em células que estão 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 TF, podem expressá-lo na ocorrência 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 liga-se ao Fator VIIa, e o complexo formado ativa pequenas quantidades de Fator IX e de Fator 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.

Níveis mínimos de Fator VIIa estão presentes na circulação de indivíduos normais, correspondendo a aproximadamente 1% da concentração plasmática total desse fator. O Fator VIIa atravessa a barreira endotelial, podendo atingir o sistema linfático. Assim, ele pode se ligar ao TF mesmo quando não existe lesão vascular, ativando os Fatores IX e X quando eles passam pelos tecidos. Esse fenômeno, denominado 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 à continuação do processo para a segunda etapa, a fase de amplificação.

Na etapa de amplificação, a pequena quantidade de trombina gerada inicialmente provoca a ativação de plaquetas, que expõem seus receptores e sítios de ligação para os fatores de coagulação ativando 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) liga-se 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. Esse 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 VIIIa/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 em fibrina. A trombina também leva à ativação do Fator XIII em XIIIa, que catalisa a modificação entre monômeros de fibrina, formando uma rede estável. Os íons cálcio são necessários em diversos passos das reações da coagulação.

Outros componentes fisiológicos circulantes regulam todo o processo de coagulação. 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).

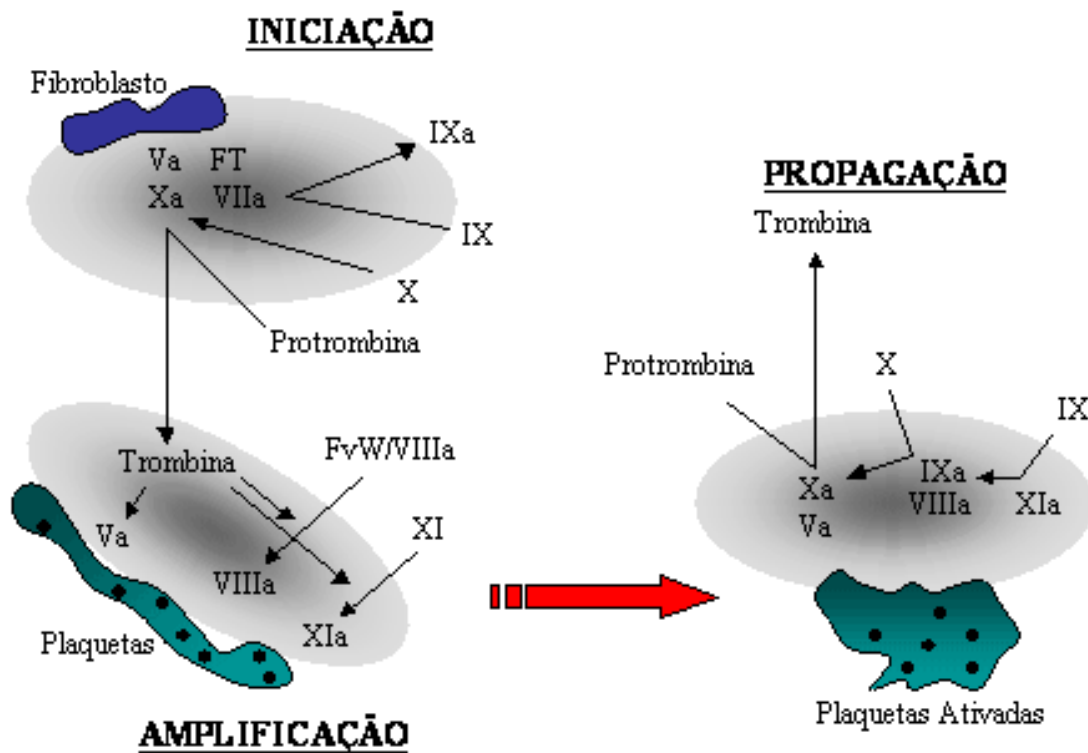


Fig.2. Modelo via celular-enzimática da cascata de coagulação sanguínea. Representação esquemática das etapas de iniciação, amplificação e propagação. Adaptado de Hoffman & Monroe (2001).

1.1.3. O Fator VIII

O Fator VIII (FVIII) é uma glicoproteína essencial para o funcionamento normal da coagulação sanguínea (Figuras 1 e 2). Essa proteína apresenta 2332 aminoácidos, e é codificada por um gene localizado na extremidade distal do braço longo do cromossomo X (Xq28), que possui 186 kilobases (Kb) de DNA genômico com 26 éxons. Esses 26 éxons variam em tamanho de 69 a 3106 pares de bases (pb). Os íntrons representam cerca de 95% do gene (Gitscheir *et al.*, 1984), e, desde que esse gene foi clonado, em 1984, um grande número de mutações causadoras de doenças têm sido descritas.

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, por ação proteolítica ou por anticorpos (Jacquemin & Saint-Remy, 1998).

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 num heterotrímero ativado (Figura 3) que consiste de uma cadeia pesada e uma cadeia leve (Fay *et al.*, 1991). Ao ser clivado pela trombina, o FVIII sofre uma alteração na sua conformação, levando à liberação do FvW e à ligação a fosfolípídeos de membrana. Essa ligação permite a interação do FVIII com o FIX, 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.

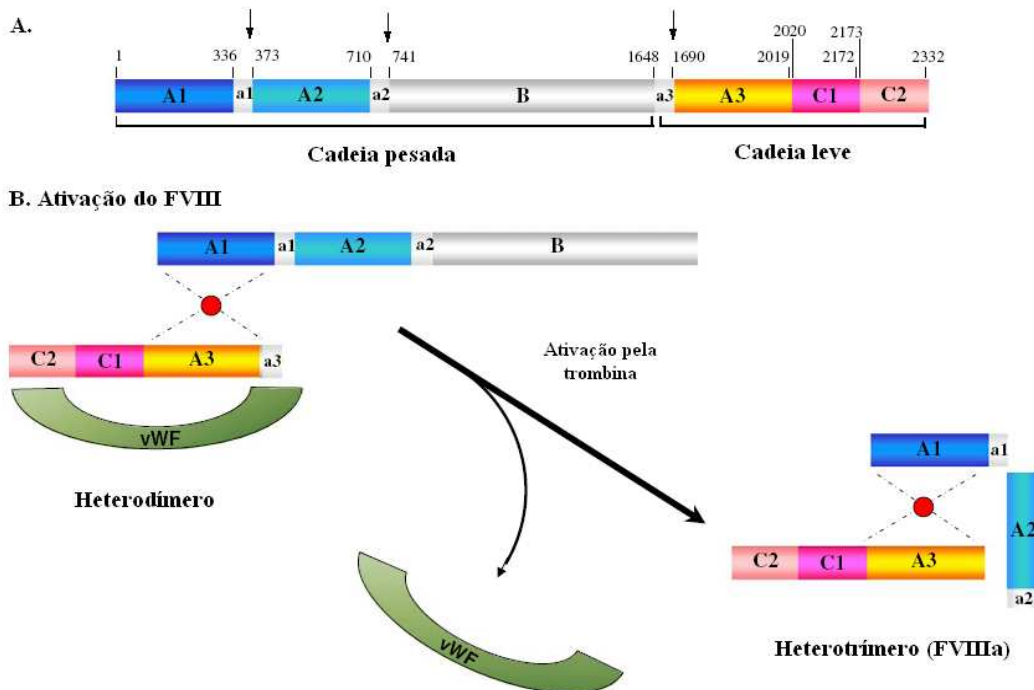


Fig.3. Estrutura e ativação do FVIII. **A.** estrutura primária do fator VIII e seus domínios. Os sítios de clivagem pela trombina são Arg 372 no sítio a1, Arg 740 no sítio a2 e Arg 1689 no sítio a3 (indicados pelas flechas). **B.** O FVIII é lançado na circulação como um heterodímero com cadeia pesada (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. A Hemofilia A

1.2.1. Introdução

A hemofilia A é uma das doenças hemorrágicas mais frequentes da via intrínseca da cascata de coagulação sangüínea. Ela é causada pela redução da atividade do Fator VIII da coagulação (FVIII), devido a alterações no gene que codifica esse fator (Gitschier *et al.*, 1984). A ausência ou a diminuição da atividade do FVIII endógeno dificulta a geração de trombina, resultando na ausência da consolidação do coágulo de fibrina, o que causa falha no reparo da lesão endotelial. O padrão de herança é recessivo ligado ao X, e a doença afeta, aproximadamente, 1 em cada 11.700 nascimentos masculinos no Rio Grande do Sul (Alexandre & Roisenberg, 1985).

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 (FvW). Um hemofílico A apresenta níveis de FVIII baixos e níveis de FvW normais. Utilizando-se os 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 da coagulação.

1.2.2. As mutações no gene do FVIII e a hemofilia A

Na hemofilia A, a redução da atividade do FVIII ocorre por alterações no gene que o codifica (F8). Devido à grande variedade de mutações que ocorrem nesse gene, a hemofilia A é uma doença com grande heterogeneidade clínica. Dependendo da mutação, a gravidade e a resposta ao tratamento são bastante diferentes. Duas inversões são as mutações mais frequentemente encontradas (inversão do intron 22 e inversão do intron 1), ocorrendo aproximadamente em 50% dos hemofílicos do tipo grave, sendo muito raros registros dessas duas inversões em hemofílicos com formas moderadas ou leves (ver, por exemplo, Tizzano *et al.*, 2003). Na inversão do intron 22, o gene é invertido como resultado de uma recombinação homóloga intracromossômica 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-1* (Lakich *et al.*, 1993). A inversão do intron 1 é baseada em um mecanismo similar, no qual uma cópia de *int1h-1* pode recombinar com uma região homóloga extragênica, levando à ruptura do gene pela inversão e à separação do éxon 1 do resto do gene (Bagnall *et al.*, 2002). Leiria *et al.* (2008) verificaram uma notável homogeneidade nas frequências dessas duas inversões em pacientes com hemofilia A grave em séries coletadas em diferentes continentes e constituídas por pessoas com características étnicas diversas (Inv 22: 40-

49% em 14 das 21 séries com pelo menos 31 pacientes testados, em 13 países; Inv 1: 0-5%).

Outras alterações genéticas que causam a hemofilia A são muito diversificadas, sendo descritas atualmente mais de 940 mutações, das quais 270 são as mais encontradas em hemofílicos graves. A maioria, aproximadamente 65%, são simples substituições de nucleotídeos, ocorrendo também pequenas deleções, inserções, outros rearranjos e inversões (HAMSTERS, acesso abril, 2011).

1.2.3. A classificação e a sintomatologia dos hemofílicos do Tipo A

Os pacientes podem ser classificados em três grupos (graves, moderados e leves) de acordo com as características clínicas apresentadas e a dosagem do fator VIII no plasma (FVIII:C). A classificação segundo a International Society of Thrombosis and Haemostasis e o Ministério da Saúde do Brasil quanto à atividade do fator VIII estabelece que os hemofílicos A graves apresentam níveis de atividade de Fator VIII no plasma <1% do que os encontrados no plasma de indivíduos normais, os moderados, de 1 a 5%, e os leves, de 5 a 50%. Cerca de 50% dos indivíduos afetados são hemofílicos graves, enquanto os moderados e leves ocorrem nas frequências de 30% e 20%, respectivamente (Antonarakis *et al.*, 1995).

Os hemofílicos graves apresentam sangramentos espontâneos ou após traumas leves frequentes; os moderados raramente têm sangramentos espontâneos, mas apresentam sangramentos importantes após pequenos traumas, enquanto que os benignos apenas manifestam a doença após traumatismos fortes ou em intervenções cirúrgicas.

As manifestações hemorrágicas podem aparecer já no primeiro ano de vida, e podem ser espontâneas ou precedidas por traumas. Sua gravidade depende dos níveis plasmáticos de FVIII. As hemorragias podem ocorrer sob a forma de hematúria, epistaxe, melena/hematêmese, ou apresentarem-se como hematomas, sangramentos retroperitoneais e intra-articulares (hemartroses), que constituem os aspectos mais característicos das formas graves (Manual de Tratamento das Coagulopatias Hereditárias, 2006).

1.2.4. O tratamento para pacientes com hemofilia A

O tratamento baseia-se na administração de fator VIII utilizando-se uma variedade de preparações derivadas de plasma humano, como a infusão de FVIII purificado, ou o obtido por técnicas de DNA recombinante. Porém, existe uma dificuldade na manutenção de níveis adequados de FVIII no plasma para proteger contra hemorragias, pois sua meia-vida (10 a 12 horas) é baixa, e é necessária a administração do FVIII a cada 2 ou 3 dias (Oldenburg *et al.*, 2009). 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, porém uma fração dos tratados desenvolve anticorpos que neutralizam o FVIII infundido e diminuem sua efetividade, os quais são denominados de inibidores do FVIII (Rieger, 1996). 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, permitindo que o gene reparado seja expresso sob o 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).

1.3. Os inibidores contra o Fator VIII

1.3.1. Introdução

Como indicado acima, uma das complicações mais sérias no tratamento de hemofílicos é o desenvolvimento de anticorpos (inibidores) contra o FVIII, que levam à diminuição da qualidade e expectativa de vida dos pacientes.

Anticorpos contra o FVIII são imunoglobulinas da classe IgG, mais comumente do isotipo IgG4, ou uma combinação de dois ou mais subtipos. Alguns inibidores podem ser também da classe IgM ou IgA (Sallah, 1997).

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 (grave, moderada e leve). No Rio Grande do Sul a incidência de inibidores nos hemofílicos graves é de 40% (Leiria *et al.*, 2008).

Os inibidores contra o Fator VIII são classificados em tipo I e tipo II. Inibidores do tipo I são anticorpos que inibem completamente o Fator VIII devido à sua alta afinidade, ligação tempo-dependente, e a uma ligação irreversível que segue uma cinética de segunda ordem. Eles apresentam-se altos após infusões repetidas de concentrados de Fator VIII e se mantêm elevados mesmo na ausência do tratamento (estímulo), podendo ser

detectados durante meses e até anos (resposta anamnésica) (Aly & Hoyer, 1992). Inibidores do tipo II não inibem completamente a função do Fator VIII, apresentando uma resposta anamnésica mínima, com um baixo título e baixa afinidade, e com um tempo independente da dose, sendo também reversíveis. Além disso, seguem uma cinética de reação de fases múltiplas (multifásica). Eles também ocorrem em pacientes com autoanticorpos (Sallah, 1997). Os hemofílicos comumente apresentam inibidores do tipo I, enquanto que os não hemofílicos apresentam predominantemente o tipo II (Nilsson, 1994). Ao desenvolver esses inibidores do tipo II, os não hemofílicos podem, então, apresentar uma hemofilia adquirida, com sintomas semelhantes aos apresentados na hemofilia A de origem genética.

Algumas doenças autoimunes como a artrite reumatóide, o lúpus eritematoso sistêmico e as polimiosites; o câncer, as doenças inflamatórias intestinais e certas inflamações cutâneas estão associadas com inibidores do tipo II (Gill, 1999).

Segundo Lacroise-Desmazes *et al.* (2008), o destino imunológico do FVIII é ditado pelo estado imune do indivíduo, pela localização do FVIII no corpo em um momento determinado e pelo microambiente inflamatório, bem como pela sua concentração e das outras substâncias da cascata de coagulação com as quais ele interage.

Estudos indicam que o desenvolvimento de inibidores contra o Fator VIII é uma resposta imune multifatorial complexa, envolvendo tanto fatores de risco genéticos quanto não-genéticos. A produção dos mesmos pode variar

conforme a idade, a origem étnica, a dose administrada, a frequência de exposição e a atividade do produto (Nilsson & Lamme, 1993; Penner, 2001; Astermark et al., 2005).

1.3.2. O mecanismo de formação dos inibidores

O sistema imune humano tem a capacidade de discriminar o próprio do não próprio. Durante a embriogênese, em torno do final do primeiro trimestre de gravidez, inicia-se o desenvolvimento da tolerância a antígenos próprios, incluindo o FVIII. Nesse período, precursores linfóides primitivos começam a transitar e amadurecer no timo. Esse desenvolvimento geralmente é completado ao nascimento, sendo mantido durante toda a vida adulta. O mecanismo de tolerância é realizado predominantemente através da deleção de células T auto-reativas (White *et al.*, 2005). Durante a sua maturação no timo, os 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 essa seleção negativa de células T que o reconhecem com alta afinidade, pois não existe fator para ser apresentado pelo timo como antígeno próprio. Assim, depois de uma infusão profilática do FVIII, ele é visto como uma proteína estranha e é então oferecido pelas células apresentadoras de antígenos (*Antigen*

Presenting Cells - APCs) através do sistema denominado Complexo Principal de Histocompatibilidade (Major Histocompatibility Complex - MHC) ou mais especificamente Antígeno Leucocitário Humano (Human Leukocyte Antigen - HLA) (Figura 4). A resposta imunológica contra o FVIII depende da presença de linfócitos B e T específicos. A ausência ou a perda de função de qualquer uma dessas células resulta em falta de resposta ou tolerância ao FVIII infundido (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). Como já indicado, 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 do plasma normal. Entretanto, os subtipos IgG₁ e IgG₂ também são encontrados (Astermark, 2006a).

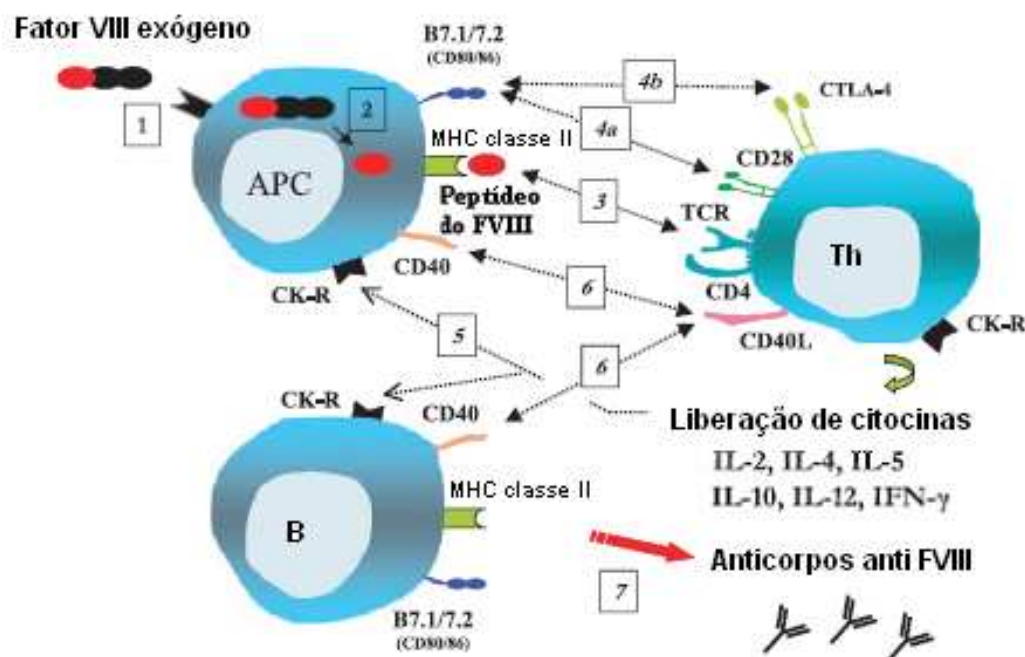


Fig.4. Formação de inibidores contra o Fator VIII em hemofilia A. O fator exógeno infundido liga-se às células apresentadoras de antígenos (APCs) [1]. Após a endocitose, oligopeptídeos serão formados por clivagem proteolítica [2]. Esses peptídeos ligam-se então ao MHC de classe II que possui afinidade a esta sequência. 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 a 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).

O fenótipo do MHC de classe II clássico do paciente interfere na resposta imune determinando se peptídeos derivados do FVIII serão apresentados às células T (Astermark, 2006b). Existem várias isoformas dessa classe de MHC que são agrupadas em três famílias: DR, DQ e DP. Cada isoforma liga-se a um conjunto de peptídeos diferentes (Rammensee *et al.*, 1995). Uma dada molécula do MHC pode apresentar mais de uma sequência de aminoácidos de uma proteína ou não apresentar qualquer sequência, não oferecendo, portanto, 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 porção da molécula irá induzir tolerância a essa parte, desde que o indivíduo possua a sequência correta do MHC II capaz de apresentar os peptídeos de tal região (White *et al.*, 2005).

Outros importantes mediadores da resposta imune (além, por exemplo, dos padrões pró-inflamatórios T_H9 e T_H17) são as citocinas, que determinam o tipo de célula que vai responder. As células T_H1 secretam a interleucina (IL) 2, o interferon- γ e o 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. As células T_H2 secretam as interleucinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, promovem a 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 (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 (títulos com pico >5 unidades Bethesda (UB) ml⁻¹) ou de baixa resposta (títulos ≤ 5UB ml⁻¹) (White *et al.*, 2001). Aqueles com inibidores transitórios (tipo II) geralmente não produzem altos títulos, e os anticorpos 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).

Acerca do desenvolvimento de inibidores, vários aspectos ainda permanecem não esclarecidos, como 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 contra o FVIII se desenvolve. O baço tem um papel crítico como ponto de encontro na iniciação de respostas imunes específicas, pois possui grande número de células dendríticas, macrófagos e células B. Essas células têm acesso imediato a antígenos circulantes no sangue, permitindo uma resposta imune rápida. 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. Os diferentes tipos de APCs também podem implicar em uma

resposta diferenciada. As células dendríticas são provavelmente as APCs mais potentes (André *et al.*, 2009).

Pelo menos cinco epítomos na molécula do FVIII são identificados como alvo dos anticorpos na maioria dos pacientes com inibidor (Figura 5). Diferentes mecanismos de ação têm sido descritos, dependendo da localização do epítomo alvo: a) bloqueio da ligação do FVIII a um de seus ligantes por impedimento estérico, b) aumento da eliminação do FVIII do plasma e c) 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 2), experimentos mostram que as principais áreas de ligação são o domínio A2 e a cadeia leve do FVIII (Scandella *et al.*, 1989). Inibidores que atuam por impedimento estérico bloqueiam a função procoagulante do FVIII por quebrar a ligação desse fator com um de seus ligantes (fosfolipídeos, FvW, FIX ou FX). Desses inibidores, 68% são direcionados contra os domínios A2/C2 (Tiarks *et al.*, 1992; Scandella *et al.*, 1993). Inibidores anti-A2 afetam interações entre o domínio A2 e o FIXa de 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 a sua eliminação da circulação (Lavigne-Lissalde *et al.*, 2009). Outro mecanismo

inibitório inclui a ligação a novos epítomos formados pelo complexo FVIII/FvW, que irá inibir a clivagem pela trombina, impedindo a dissociação do complexo e proporcionando um efeito catalítico ao induzir a clivagem proteolítica do FVIII (Astermark, 2006a).

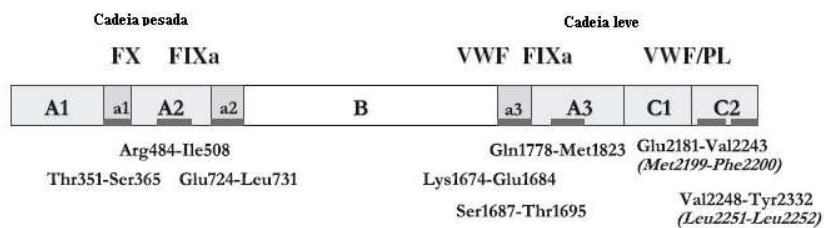


Fig.5. Principais epítomos do fator VIII. Modelo esquemático que mostra os domínios do Fator VIII e a localização dos principais epítomos que se ligam a anticorpos anti FVIII, nos domínios a1, A2, a2, a3, A3 e C2. Adaptado de Astermark (2006a).

1.3.3. Os fatores de risco para a formação dos inibidores

Tanto fatores genéticos quanto não-genéticos influenciam a suscetibilidade dos pacientes a desenvolver inibidores.

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 do inibidor, intensidade do tratamento e infecções associadas estão entre os fatores não-genéticos (Zhang *et al.*, 2009).

Em uma revisão epidemiológica sobre inibidores, Goudemand *et al.* (2006) investigaram a influência de diferentes concentrados de FVIII na

formação dos mesmos. Nesse estudo, sessenta e dois pacientes foram tratados com FVIII purificado de plasma, contendo FvW, e 86 pacientes receberam FVIII recombinante. Pacientes tratados somente com produto derivado de plasma tiveram menor incidência de formação de inibidores (0 – 12,4%) do que os tratados com FVIII recombinante (36 – 38,7%). Produtos derivados de plasma com diferentes concentrações de FvW parecem impedir a ligação do inibidor ao FVIII infundido (Ghosh & Shetty, 2009). Na França, em um estudo retrospectivo, apenas 11% dos pacientes tratados com FVIII derivado de plasma desenvolveram inibidor, enquanto entre os tratados com o FVIII recombinante esse número foi de 31%. Apesar desses dados, a determinação da influência do tipo de produto utilizado no desenvolvimento de inibidor requer mais estudos.

Grande parte dos indivíduos que desenvolvem anticorpos anti FVIII o fazem no início da vida, depois de receberem uma média de 9-12 tratamentos com fator exógeno. Contudo, não existe uma idade provável ou um determinado número de tratamentos realizados que façam com que um indivíduo esteja completamente seguro quanto ao risco de desenvolver inibidores (Salviato *et al.*, 2007).

A idade de início do tratamento com infusão de FVIII é outro fator de risco não genético. Em um estudo realizado por Lorenzo *et al.* (2001) pôde-se observar que a incidência de inibidores em pacientes que começaram o tratamento antes dos seis meses de idade foi de 41%, comparada com 29% entre os pacientes cujo tratamento teve início dos 6 aos 12 meses e 12%

quando o tratamento se iniciou após um ano de idade. O maior risco de desenvolvimento de inibidores é durante os primeiros 50 dias de tratamento, com reações mais raras ocorrendo após 200 dias de exposição. 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 inibidores. Além disso, o ambiente de injúria pode ativar células do sistema imune que viriam a reconhecer o FVIII infundido (Ghosh & Shetty, 2009). O modo de administração também parece influenciar na formação de inibidores. A infusão contínua parece oferecer mais risco para o desenvolvimento de inibidores, quando comparada a uma única injeção (Zhang *et al.*, 2009).

Entre os fatores genéticos, o tipo de mutação do gene do FVIII, a etnia, a história familiar sobre a presença de inibidores, o genótipo HLA e polimorfismos em genes de citocinas poderiam estar envolvidos.

Estudos genéticos em pacientes com inibidores devem considerar as duas áreas de maior variação: a mutação que causou a doença e o genótipo do seu sistema imunológico. Mutações que fazem com que a proteína do FVIII esteja ausente ou truncada geralmente estão associadas com uma maior incidência de desenvolvimento de inibidores (Fakharzadeh & Kazazian, 2000). Entre essas mutações estão as inversões dos introns 1 e 22, grandes deleções e mutações *nonsense* (Astermark, 2006b). Especificamente no que se refere à inversão no intron 22, hemofílicos A grave portadores da mesma apresentam prevalências de inibidores em

nove séries estudadas na Europa, Ásia e América Latina variando entre 5% e 51%, a frequência maior tendo sido obtida no Rio Grande do Sul (Leiria *et al.*, 2008). A incidência de formação de inibidores deve ser menor em pacientes cuja mutação do FVIII ainda permita que certa quantidade de FVIII seja produzida (Zhang *et al.*, 2009).

Analisando-se as mutações do gene do FVIII listadas na base de dados HAMSTeRS, observa-se que mutações *missense*, pequenas deleções e mutações em sítios de *splicing* são consideradas de baixo risco para o desenvolvimento de inibidores. As pequenas deleções introduzem um códon de terminação prematuro, logo, a incidência de inibidores nesse caso deveria ser a mesma que em mutações *nonsense*; porém, isso não ocorre. Provavelmente mecanismos de reparo que restauram a fase de leitura até uma extensão suficiente para a produção de pequena quantidade de FVIII que torna o paciente tolerante ao FVIII infundido impedem que isso aconteça.

Segundo Tuddenham & Mcvey (1998), grandes deleções e mutações de ponto nos hemofílicos graves estão associadas com maior incidência de inibidores. Por outro lado, mutações de ponto no fenótipo leve ou moderado têm baixa incidência de inibidores. Uma possível explicação para este fato é que as mutações de ponto em pacientes graves introduzem códons de terminação prematuros, levando a uma falha na produção de FVIII detectável no plasma, o que faz com que o sistema imune considere o FVIII infundido como estranho. Em pacientes com hemofilia moderada ou leve,

as mutações de ponto permitem a produção de pouca quantidade de proteína ou quantidade normal não funcional, tornando esses pacientes mais tolerantes ao fator infundido.

Uma variação individual na suscetibilidade ao desenvolvimento de inibidores também é gerada pelo genótipo do MHC do paciente. Em estudos realizados com pacientes hemofílicos A que apresentavam a 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 inibidores (Oldenburg *et al.*, 1997; Hay *et al.*, 1997).

Apesar da presença de inibidores na maior parte dos casos estar relacionada com a presença de mutações que determinam efeitos graves, uma proporção de pacientes desenvolve inibidores mesmo na presença de mutações de menor efeito (Salviato *et al.*, 2007). Além disso, muitos pacientes com mutações de alto risco e genótipos desfavoráveis não desenvolvem inibidores, e a razão para esse fato ainda não está esclarecida (Bafunno *et al.*, 2009). Isso provavelmente 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. Acredita-se que alguns pacientes não possuam a combinação necessária entre o defeito da molécula do FVIII e o genótipo do sistema imune.

Alguns 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 têm sido analisados em alguns estudos para verificar sua relação com o 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 inibidores em irmãos hemofílicos também foi encontrada no estudo MIBS (*Malmo International Brother Study group*) (Astermark *et al.*, 2006a).

A história familiar prévia de formação de inibidores é outro fator genético de risco para o desenvolvimento dos mesmos. Em um estudo feito por Astermark *et al.* (2005), foi encontrada concordância entre familiares de 78,3%. Quando comparado com outros parentes hemofílicos, uma maior concordância na incidência de inibidores é observada entre irmãos. Se cada membro de uma família de hemofílicos tiver a mesma mutação, e outros fatores genéticos além dessas mutações estiverem envolvidos, é lógico pensar que o risco de formação de inibidores deve ser maior entre irmãos hemofílicos do que entre outros graus de parentesco. 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 confirma a hipótese de que outros fatores genéticos, além das mutações que levaram à hemofilia, têm papel decisivo no desenvolvimento de inibidores. No entanto, se o desenvolvimento de inibidores fosse exclusivamente genético, gêmeos monozigóticos deveriam apresentar o mesmo fenótipo. Entretanto, gêmeos monozigóticos com fenótipos discordantes têm sido descritos, indicando que fatores não-genéticos influenciam essa resposta imune (Astermark *et al.*, 2001).

Outro fator genético que pode influenciar no desenvolvimento de inibidores é a etnia, como indicado em vários estudos de meta análise. A prevalência de inibidores em pacientes graves de origem afro-americana e latina seria duas vezes maior que do que a prevalência desses anticorpos em europeus ou euro-descendentes (Scharrer *et al.*, 1999). O espectro de mutações do FVIII não difere entre os grupos étnicos, portanto acredita-se que a variação deva ser atribuída tanto a fatores genéticos relacionados ao sistema imunológico quanto a outros fatores de natureza ambiental (Ghosh & Shetty, 2009).

1.3.4. O tratamento de pacientes com inibidores

Como já salientado, o desenvolvimento de inibidores é a principal complicação no tratamento da hemofilia, pois compromete a eficácia da terapia de reposição. Clinicamente, a presença de inibidores manifesta-se

pela má resposta ao tratamento habitual ou pelo aumento da frequência e/ou gravidade dos episódios hemorrágicos. Assim, deve-se avaliar a possibilidade de surgimento de inibidores e proceder à pesquisa laboratorial quando um paciente apresentar sangramento que não responda adequadamente ao tratamento habitual e/ou em face ao aumento da frequência dos sangramentos (Manual de Tratamento das Coagulopatias Hereditárias, 2006).

Ter Avest *et al.* (2008) desenvolveram uma fórmula que permite calcular o risco de que determinado paciente desenvolva inibidores levando em conta: a) história familiar positiva; b) o tipo de mutação no gene do FVIII; e c) o grau de intensidade do tratamento inicial. O índice tem bom valor preditivo, embora, como salientou White (2008), outros fatores também tenham de ser considerados. Seja como for, este tipo de avaliação será fundamental para que as companhias que produzem produtos recombinantes de FVIII possam desenvolver estratégias para a elaboração de produtos menos imunogênicos.

Atualmente, as principais abordagens para o tratamento de episódios hemorrágicos em pacientes com inibidores são altas doses de FVIII humano e uso de terapia com produtos “bypass”, que produzem a hemostasia através da eliminação do passo dependente do FVIII e do fortalecimento da geração de trombina. Entre esses produtos estão o complexo protrombínico concentrado (PCC), o complexo protrombínico concentrado ativado (aPCC) e o Fator VII recombinante ativado (rFVIIa)

(Gringeri *et al.*, 2003). Dois desses tratamentos (aPCC e rFVIIa) foram comparados por Carlsson *et al.* (2008), que concluíram ser o primeiro mais vantajoso em termos de custo por episódio hemorrágico. Terapias alternativas para sangramentos agudos em pacientes com inibidor incluem também a remoção do anticorpo por imunoadsorção ou plasmaferese, seguido de infusão de FVIII (Kempton & White, 2009).

No Brasil, a primeira linha de tratamento para sangramentos em pacientes com inibidores é realizada principalmente com aPCC, sendo também utilizados rFVIIa, PCC e altas doses de Fator VIII humano, mas há discussão sobre o custo-benefício de cada um (Goudemand, 1999; Ozelo *et al.*, 2007; Carlsson *et al.*, 2008). Nos últimos anos o Ministério da Saúde tem adquirido o Fator VII ativado (FVIIa) recombinante. Em função do seu altíssimo custo, este medicamento é reservado para aqueles pacientes que apresentam inibidores de título alto, que não respondem ao uso de PCC/aPCC, ou para aqueles que apresentam reação alérgica grave (com risco de vida) aos mesmos (Manual de Tratamento das Coagulopatias Hereditárias, 2006). Portanto, o tratamento de hemofílicos com inibidores é muito caro, tanto em termos absolutos quanto em relação ao tratamento de hemofílicos sem inibidores (segundo Goudemand, 1999, o custo é 3 vezes maior).

1.4. Sistemas que podem afetar a resposta imune ao Fator VIII

1.4.1. IL4 e IL4R

Está bem estabelecido que o desbalanço entre as citocinas T_H1 e T_H2 tem um papel crucial na desregulação da resposta imune, levando à patogênese de doenças autoimunes (Cantagrel *et al.* 1999; Rabinovitch 1994; Sartor 1994). Então, os genes das citocinas T_H1 e T_H2 e seus respectivos receptores podem ser considerados bons candidatos para modificar o risco para essas doenças. O exemplo prototípico da citocina T_H2 é a interleucina 4 (IL4), que exerce uma ampla gama de efeitos. Ela estimula o desenvolvimento de linfócitos T_H2 , inibe a função dos macrófagos e reduz a produção de interferon- γ , IL2, IL6 e TNF pelas células T_H1 , agindo como um potente antiinflamatório (Tew *et al.*, 1989; Van Kampen *et al.*, 2005).

A citocina IL4 é codificada pelo gene *IL4*, que compreende quatro éxons e tem 10kb de tamanho. Esse gene está localizado no cromossomo 5, na região 5q31.1, junto com outros genes de citocinas T_H2 , tais como IL3, IL5, IL9, IL13 e IL15 (Le Beau *et al.*, 1989). Polimorfismos podem causar significativas mudanças na função por alterar os níveis ou a atividade de proteínas específicas. Devido à sua proximidade física no cromossomo, três polimorfismos no gene da IL4 estão em forte ou perfeito desequilíbrio de ligação uns com os outros, formando haplótipos (Shibata *et*

al., 2002; Kantarci *et al.*, 2003). O primeiro polimorfismo é o SNP -590C>T (rs2243250). Ele se localiza na região promotora do gene *IL4*, 590 pares de bases antes do sítio de início da tradução. Este polimorfismo é também designado como -524C>T, a contagem sendo então relacionada ao sítio de início da transcrição. O segundo SNP que vem sendo investigado é o -33C>T (rs2070874), localizado na região 5' não traduzida do gene da *IL4* (Shibata *et al.*, 2002). O terceiro é um VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) de 70 pares de bases localizado no terceiro íntron (Arai *et al.*, 1989). Haplótipos formados por estes polimorfismos foram associados com doenças inflamatórias e autoimunes, como revisado por Vanderbroek & Goris (2003). Em nosso trabalho foi estudado apenas o primeiro desses três polimorfismos.

Num estudo realizado por Astermark *et al.* (2006b) foi analisada a associação entre o polimorfismo -590C>T (rs2243250) e o desenvolvimento de inibidores em hemofílicos A. O genótipo mais comum foi o CC, encontrado em 59% dos pacientes, dos quais 46% apresentavam histórico de desenvolvimento de inibidores. O genótipo CT foi observado em 28% dos pacientes, dentre os quais 51% tinham inibidores. O genótipo de menor frequência foi o TT, encontrado em 13% dos pacientes, sendo que 41% deles apresentavam inibidores. No total, foram observados inibidores em 48% dos pacientes com o alelo T, em comparação com 46% dos pacientes sem esse alelo. Não foi detectada associação entre os alelos ou os genótipos encontrados e o desenvolvimento de inibidores nesses pacientes.

O polimorfismo -590C>T (rs2243250) no gene da IL4 foi também investigado por Chaves *et al.* (2010) em um grupo de hemofílicos A brasileiros. A análise dos resultados da genotipagem também não mostrou correlação entre esse polimorfismo e o desenvolvimento de inibidores nesses pacientes.

Em nosso estudo foi analisada a relação entre esse polimorfismo no gene da IL4 e o desenvolvimento desses inibidores em hamofílicos A graves.

O receptor da interleucina 4 é uma proteína transmembrana que pode ligar-se à interleucina 4 e à interleucina 13 para regular a produção de IgE. A proteína codificada pode também ligar-se à interleucina 4 para promover a diferenciação das células T_H2. A forma solúvel da proteína codificada pode ser produzida por processamento alternativo ou por proteólise da proteína ligada à membrana, e essa forma solúvel pode inibir a proliferação celular mediada por IL4 e a regulação aumentada de IL5 pelas células T. Duas variantes que codificam diferentes isoformas, uma forma ligada à membrana e uma forma solúvel, foram encontradas para este gene, que está localizado no cromossomo 16, na região 16p12.1-p11.2. Variantes alélicas nesse gene têm sido associadas com atopia, uma condição que pode se manifestar como rinite alérgica, sinusite, asma ou eczema (NCBI, 2011).

Em um estudo realizado por Erlich *et al.* (2009) não foi encontrada associação entre variantes do receptor da IL4 com a diabetes melito tipo 1,

enquanto Ha *et al.* (2008) analisaram o polimorfismo 1902A>G (rs1801275) e observaram um efeito protetor do alelo 1902G com relação à obesidade. Não foi encontrado, entretanto, qualquer estudo de associação entre variantes desse sistema com a prevalência de inibidores contra o FVIII em hemofílicos A graves.

Em nosso trabalho, foi analisada a relação entre o polimorfismo 1902A>G (rs1801275) e o desenvolvimento desses anticorpos em hemofílicos A graves.

1.4.2. IL10

A interleucina 10 é uma importante citocina que exerce um amplo espectro de atividades, tendo propriedades antiinflamatórias e imunossupressoras (Llorente *et al.*, 1995). Ela aumenta a produção *in vitro* de todos os tipos de imunoglobulinas pelas células mononucleares do sangue periférico em pacientes com determinadas doenças autoimunes, e sua concentração sérica está correlacionada com a atividade da doença nesses pacientes (Houssiau *et al.*, 1995; Rosado *et al.*, 2008). Estudos de gêmeos e de famílias sugerem que aproximadamente 75% da variação na produção da IL10 é determinada geneticamente, e essa variação parece ser controlada a nível transcricional (Eskdale *et al.*, 1998). O gene que a produz está localizado no cromossomo 1, na região 1q31-32, e apresenta três principais SNPs variáveis na região promotora: -1082G>A (rs1800896),

-819C>T (rs1800871), e -592C>A (rs1800872). Esses SNPs estão associados a mudanças na expressão desse gene, e estão portanto relacionados a uma alta ou baixa produção dessas citocinas. O alelo -1082G está associado a quantidades elevadas, enquanto o -1082A determina níveis baixos de síntese da mesma. Além disso, considerando-se os três locos, o haplótipo GCC está relacionado a uma alta síntese de IL10, ACC com uma produção intermediária, e ATA a uma baixa produção dessa citocina (Scassellati *et al.*, 2004).

Um estudo realizado por Pavlova *et al.* (2009) analisou a relação entre esses três polimorfismos no gene da IL10 e o desenvolvimento de inibidores contra o Fator VIII em pacientes com hemofilia A grave. O único polimorfismo que apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes com e sem inibidores foi o -1082A>G (rs1800896). A frequência do alelo G foi maior em pacientes com inibidor do que em pacientes que não desenvolveram anticorpos ($p=0,008$). Nesse trabalho foi analisada também a relação entre os haplótipos da IL10 e o desenvolvimento desses inibidores. Uma prevalência consideravelmente aumentada do haplótipo GCC foi observada em pacientes com inibidores ($p=0,0065$).

Bafunno *et al.* (2010) também analisaram a associação entre o polimorfismo -1082A>G (rs1800896) no gene da IL10. Não foram encontradas diferenças significativas nas distribuições alélicas e genotípicas entre os grupos de pacientes com e sem inibidores.

Em um trabalho desenvolvido por Chaves *et al.* (2010), foi considerada a associação entre os haplótipos acima referidos e a presença desses inibidores. O diplótipo GCC/ATA é mais frequente no grupo de pacientes sem inibidores ($p=0,043$), está associado com uma produção intermediária de IL10, e indivíduos portadores têm uma chance 3,55 vezes menor de desenvolver inibidores quando comparada à de outros pacientes. Já o diplótipo GCC/ACC, que também está associado a uma produção intermediária de IL10, apresentou-se em maior frequência no grupo de pacientes com inibidores ($p=0,0267$), e os indivíduos com esse diplótipo têm uma chance 5,82 vezes maior de desenvolverem inibidores anti-FVIII do que os outros pacientes. Esses resultados mostram que uma associação simples considerando somente o nível de síntese de uma proteína pode não ser suficiente para explicar o desenvolvimento de inibidores.

Além desses três principais SNPs, a variante de 134pb do microsatélite IL10G de repetições de CA também na região promotora do gene da IL10 é bastante importante. Essa variante está associada às concentrações de auto-anticorpos tanto em lúpus eritematoso sistêmico quanto em miastenia grave e granulomatose de Wegener, e com a concentração de imunoglobulinas monoclonais no mieloma múltiplo (Zhou *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 1999a; Zheng *et al.*, 2001).

Astermark *et al.* (2006b) encontraram inibidores contra o fator VIII em 73% dos pacientes com hemofilia A que apresentavam o alelo 134, enquanto apenas 37% daqueles sem esse polimorfismo desenvolveram

inibidores ($P = 0.001$). Uma associação significativa entre esse alelo e o desenvolvimento de inibidores foi encontrada também nos hemofílicos A graves. Nesse grupo, a variante foi encontrada em 41% dos pacientes com inibidores e em apenas 11% daqueles sem inibidores ($P < 0.001$). Hemofílicos com esse alelo podem apresentar um fenótipo de alta secreção que, sob o estímulo antigênico do FVIII deficiente, desenvolvem uma expansão das células B clonais específicas e a formação de inibidores.

Em nosso trabalho, foram analisados os polimorfismos -1082A>G (rs1800896), -819C>T (rs1800871) e -592A>C (rs1800872) no gene da IL10 e sua relação com o desenvolvimento de inibidores em pacientes hemofílicos A graves.

1.4.3. *TNF α* e *TNFR1*

O fator de necrose tumoral alfa (TNF α) é uma importante citocina com potentes funções pró-inflamatórias e imunomodulatórias, e polimorfismos nesse gene têm sido associados com doenças autoimunes mediadas por anticorpos (Wilson *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 1999). Vários polimorfismos foram identificados no gene do TNF α , localizado em 6p21, na região de classe II do HLA, mas poucos apresentaram frequências alélicas maiores que 5%. O polimorfismo mais estudado com efeitos patofisiológicos é o TNF α -308G>A (rs1800629), na região promotora do gene. Este polimorfismo está associado com níveis aumentados de TNF α em doenças

inflamatórias, com a formação de anticorpos em pacientes com miastenia gravis e com o início precoce dessa doença (Huang *et al.*, 1999).

Analisando a relação entre esse polimorfismo e o desenvolvimento de inibidores em hemofílicos A graves, Astermark *et al.* (2008) identificaram inibidores para o FVIII em 73% dos pacientes com o genótipo TNF α -308 A/A, em 40% daqueles com genótipo G/G e em 47% dos pacientes heterozigotos G/A (P = 0.008). Estes dados sugerem que o polimorfismo TNF α -308G/A pode ser um bom marcador e potencial modulador da resposta imune na terapia de reposição por esse fator.

Em outro trabalho desenvolvido por Astermark *et al.* (2006a) foram estudados alguns polimorfismos (-827C>T (rs1799724), -308G>A (rs1800629), e -238A>G (rs361525)) no gene do TNF α em 164 pacientes, dentre os quais 124 eram hemofílicos A graves. A única associação significativa encontrada foi entre o genótipo -308A/A e o grupo de pacientes hemofílicos A graves com inibidores (p<0,001).

Um trabalho realizado por Pavlova *et al.* (2009) analisou a relação entre esses quatro polimorfismos e o desenvolvimento de inibidores em hemofílicos A graves. O único deles que apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos com e sem inibidor foi o -308G>A (rs1800629). A prevalência de homozigotos AA foi significativamente diferente entre os dois grupos analisados (7% e 2%) (p=0,031). Os dados das frequências alélicas confirmaram a alta

frequência do alelo -308A em pacientes com inibidor (22%) em relação aos pacientes sem inibidor (13%) ($p=0,0114$).

Em um estudo que considerou o mesmo polimorfismo, Bafunno *et al.* (2010) encontraram a frequência do alelo A levemente aumentada em pacientes com inibidores, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,919$).

O TNFR1 é um dos principais receptores do TNF α , sendo membro da superfamília de receptores do TNF. Essa proteína é codificada por um gene que se localiza no cromossomo 12, na região 12p13.2, e pode mediar a apoptose e funcionar como um regulador da inflamação (NCBI, 2011). As atividades pleiotrópicas do TNF α são mediadas pela sua ligação a receptores de TNF do tipo I (TNFR1) e tipo II (TNFR2) (Hohmann *et al.*, 1989). Receptores de TNF são inicialmente sintetizados como proteínas ancoradas à membrana, que podem ser liberadas da superfície celular através de clivagem proteolítica pela enzima conversora de TNF alfa (*TNF alpha converting enzyme* - TACE); estes receptores solúveis funcionam como atenuadores fisiológicos da atividade do TNF α através de competição por ligantes do TNFR (Xanthoulea *et al.*, 2004).

A sinalização do TNF é um processo complexo; TNFRs não têm nenhuma atividade enzimática por si só, e devem recrutar proteínas citosólicas para ativar vias múltiplas a jusante (Wallache *et al.*, 1999). Ambos os receptores promovem diferentes respostas celulares; no entanto,

os dois compartilham a capacidade de induzir o fator nuclear- κ B e vias apoptóticas (Pimentel-Muinos & Seed, 1999; Tartaglia *et al.*, 1991).

O TNFR1 é constitutivamente expresso na maioria dos tecidos e parece ser o mediador chave da sinalização do TNF (Wajant *et al.*, 2003).

Valle *et al.* (2010) analisaram a relação entre o polimorfismo -383A>C no gene do TNFR1 e o desenvolvimento de artrite reumatóide. As comparações das frequências alélicas e genotípicas entre os dois grupos estudados (pacientes com artrite reumatóide e indivíduos saudáveis) não apresentou diferenças significativas. Nenhum estudo de associação entre variantes desse sistema com a prevalência de inibidores anti-FVIII em hemofílicos A graves foi encontrado.

Em nosso trabalho, foi analisada a relação entre o polimorfismo 303A>G (rs4149622) no gene do TNFR1 e o desenvolvimento de inibidores anti-FVIII em hemofílicos A graves.

1.4.4. Outros

Além dos polimorfismos nos genes descritos acima, outros fatores genéticos têm sido estudados com relação ao desenvolvimento de inibidores em hemofílicos A graves.

1.4.4.1. HLA-G

O antígeno leucocitário humano (HLA)-G pertence à família das moléculas do HLA de classe Ib não-clássicas, que também inclui o HLA-E e HLA-F, e é predominantemente associado à tolerância materno-fetal (Rouas-Freiss *et al.*, 1997). Hoje se sabe que tanto o HLA-G solúvel no plasma quanto o ligado a membranas funciona como um múltiplo imunorregulador, com importante função imunossupressora e possível indução de imunotolerância (Favier *et al.*, 2007).

O polimorfismo de inserção/deleção de 14pb (rs1704) (Harrison *et al.*, 1993) localizado na região 3' não traduzida do gene do HLA-G parece ter um importante papel no seu processamento 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.

Outro polimorfismo localizado na região 3' não traduzida, na posição +3142 (rs1063320), parece alterar a ligação de micro RNAs (miRNAs), influenciando assim na estrutura do RNA e na repressão da tradução mediada por esses elementos (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).

Rosset (2010) analisou a relação entre esses dois polimorfismos no gene do HLA-G e o desenvolvimento de inibidores em hemofílicos A graves. A frequência do alelo da inserção de 14pb foi um pouco maior entre os indivíduos com inibidor, mas não atingiu significância estatística ($p=0,449$). Analisando o SNP HLA-G +3142C/G, também não foi encontrada diferença significativa entre a distribuição alélica e genotípica de cada um dos grupos.

1.4.4.2. *PTPN22*

O gene da proteína tirosina fosfatase não receptora tipo 22 (*PTPN22*) codifica uma proteína tirosina fosfatase hematopoiética de 110kD, também conhecida como Lyp (Cohen *et al.*, 1999). Proteínas tirosina fosfatases (PTPs) têm diversos papéis como reguladoras negativas de cascatas estimulatórias de sinalização 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).

Conforme revisão feita por Stanford *et al.* (2010), três relatos em 2004 documentaram a associação entre o SNP 1858C>T (rs2476601) do gene *PTPN22* e a diabetes tipo 1, a artrite

reumatóide, o lúpus eritematoso sistêmico e a Doença de Graves. Outros relatos encontraram associação entre esse polimorfismo e a Doença de Addison, o vitiligo, a miastenia grave e a esclerose sistêmica.

Como já mencionado, Baffuno *et al.* (2010) realizaram um estudo cujo objetivo foi avaliar se polimorfismos em diferentes genes que modulam a resposta imune poderiam conferir susceptibilidade para o desenvolvimento de inibidores em um grupo de italianos hemofílicos com e sem história de inibidores. As frequências alélicas observadas para o polimorfismo acima indicado não diferiram significativamente entre os pacientes com inibidores e sem inibidores ($p = 0,968$). Rosset (2010) também não encontrou diferenças significativas nas frequências do mesmo nos grupos com e sem inibidores.

1.4.4.3. HLA Classe II

As moléculas do antígeno leucocitário humano (Human Leukocyte Antigen - HLA) de classe II têm um papel essencial na apresentação de peptídeos do FVIII para as células TH CD4-positivas. Em particular, foi relatado que os alelos DRB1*15 e DQB1*0602 do HLA de classe II podem ter uma influência sobre o desenvolvimento de inibidores anti-FVIII (Hay *et al.*, 1997; Oldenburg *et al.*, 1997).

Pavlova *et al.* (2009) estudaram esses dois alelos e sua possível relação com o desenvolvimento de inibidores em pacientes com hemofilia A grave. O DRB1*1501 foi encontrado mais frequentemente em pacientes com inibidores do que nos que não os apresentavam ($p=0,0054$). Todos os outros alelos desse locus não mostraram diferenças estatisticamente relevantes entre esses grupos de pacientes. Na comparação dos resultados obtidos para o locus DQ, foi detectada uma diferença estatisticamente significativa apenas em DQB1 * 0602. Dezesesseis por cento dos pacientes com inibidores apresentaram o DQB1*0602, enquanto no grupo de pacientes sem inibidores esse número foi de 9% ($p=0,0117$).

1.4.4.4. CTLA-4

O antígeno 4 de linfócitos T citotóxicos (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 - CTLA4) é uma segunda molécula co-estimulatória, e é um homólogo do CD28. Ele é expresso apenas em células T ativadas, ligando-se à molécula B7 acessória, e diminuindo a expressão de células T dependentes de resposta imune (Djukanovic, 2000). Construções de CTLA-4-Ig, que suprimem a interação entre B7 em células apresentadoras de antígenos e CD28 em linfócitos T, foram utilizadas para impedir o início da resposta imune anti-FVIII em camundongos com deficiência desse fator (Hausl *et al.*, 2004).

Pavlova *et al.* (2009) estudaram a relação entre os polimorfismos 49G>A (rs231775), -318C>T (rs5742909) e CT60A>G (rs3087243) e o desenvolvimento de anticorpos anti-FVIII em pacientes com hemofilia A grave. Não houve diferença estatisticamente significativa nas frequências genóticas para os três polimorfismos testados nos pacientes com e sem inibidores. No entanto, foi observada uma tendência para menor frequência do alelo A do polimorfismo CT60A>G (rs3087243) em pacientes com inibidores ($p=0,06$).

Baffuno *et al.* (2010) analisaram o polimorfismo 49G>A (rs231775), e também não encontraram associação entre ele e o desenvolvimento de inibidores em hemofílicos A graves.

1.4.4.5. FOXP3

O *forkhead box P3* (FOXP3) é um gene localizado no cromossomo X, na região Xp11.23, e codifica uma proteína que é membro da família de reguladores de transcrição *forkhead/winged-helix*. Defeitos nesse gene são a causa de poliendocrinopatias autoimunes, enteropatias e da síndrome da autoimunidade-imunodeficiência ligada ao X. Foram identificados transcritos obtidos por processamento alternativo que codificam diferentes isoformas (NCBI, 2011).

No mesmo estudo citado anteriormente, Baffuno *et al.* (2010) analisaram a relação entre o polimorfismo 1189C>T (rs28935477) no gene do FOXP3 nesses dois subgrupos. Essa análise revelou ausência de variação, todos os indivíduos apresentando somente o alelo C.

1.4.4.6. IRF5

O Fator Regulador de Interferon 5 (*Interferon Regulatory Factor 5* – IRF5) é codificado por um gene localizado no cromossomo 7, na região 7q32. Esse gene codifica um membro da família de fatores reguladores de interferon (interferon regulatory factors - IRF), um grupo de fatores de transcrição com diversos papéis, incluindo a ativação do vírus mediada por interferon e a modulação do crescimento celular, a diferenciação, a apoptose e a atividade do sistema imune. Os membros da família IRF são caracterizadas por um domínio N-terminal conservado de ligação ao DNA contendo repetições de triptofano. Vários transcritos que codificam diferentes isoformas foram encontrados para esse gene, e um polimorfismo de inserção-deleção de 30 nucleotídeos (rs60344245) pode resultar na perda de um segmento de 10 aminoácidos (NCBI).

Quanto ao polimorfismo 198G>T (rs2004640) no gene do IRF5, os mesmos autores citados na seção anterior (Baffuno *et al.*,

2010) não encontraram diferenças significativas na distribuição de alelos e genótipos nos dois subgrupos de pacientes ($p = 0,964$).

CAPÍTULO 2

OBJETIVO

O presente projeto teve por objetivo determinar os genótipos de hemofílicos graves que apresentavam ou não inibidores anti Fator VIII quanto às mutações em genes candidatos que predisporiam ao desenvolvimento desses anticorpos. Em especial foram escolhidos genes envolvidos no sistema imune (interleucinas IL4, IL4R e IL10; e os fatores de necrose tumoral TNF α e TNFR1), e testada a associação de seus alelos com a referida diferença.

CAPÍTULO 3

ARTIGO

Manuscrito a ser submetido à revista Haemophilia

**Immune system polymorphisms and Factor VIII inhibitor formation in
Brazilian haemophilia A severe patients**

D. AGOSTINI, M. R. BOTTON, C. ROSSET, F. M. SALZANO and E. BANDINELLI

*Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.*

RUNNING TITLE: IMMUNE SYSTEM POLYMORPHISMS IN HAEMOPHILIA A

Keywords: Factor VIII inhibitors, Brazilian haemophiliacs, severe haemophilia A,
cytokine polymorphisms, interleukins, tumor necrosis factor.

Correspondence: Francisco M. Salzano, Departamento de Genética, Instituto de
Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15055, 91501-970
Porto Alegre, RS, Brasil.

Tel.: +55 51 3308 6747; fax: +55 51 3308 9823.

e-mail:

francisco.salzano@ufrgs.br

Summary. A total of 154 severe Brazilian haemophilia A patients with (47) and without (107) Factor VIII inhibitors were tested in relation to 10 polymorphisms in five systems (IL4, IL4R, IL10, TNF α , and TNFR1) related to the immune response. Three of them, IL4R 1902A>G, TNF α -863A>C, and TNFR1 303A>G have never been studied in such series. Statistically non-significant differences were observed by us in all comparisons, in agreement with some, but not all previous studies. The question of why some, but not all severe haemophilia A patients develop anti-Factor VIII antibodies remain open.

Introduction

The main problem facing the replacement therapy of severe haemophilia A patients is the development of Factor VIII (FVIII) inhibitors. Many factors are involved in this immune response [1] and the characteristics, mechanisms of action, and epitope mapping of these antibodies were considered in [2]; another paper examined methods of prevention and immune modulation [3]. Association of the development of these antibodies and immune system polymorphisms yielded contradictory results [4-8]. Components of this system are the cytokines, involved in its cell communication, and more specifically, the interleukins, that promote cell growth and differentiation, as well as the tumour necrosis factors, which have cytotoxic effects on tumour, but not on normal cells. Due to the contradictory results indicated above, we decided to test 10 polymorphisms which affect these substances as part of a long-term investigation aiming at identifying factors related to FVIII inhibitor formation in a large sample of severe haemophilia A Brazilian patients [9].

Materials and methods

Patients and samples

A total of 154 severe haemophilia A patients were studied, ascertained at Rio Grande do Sul's (Brazil) Center of Haematology and Haemotherapy (HEMOCENTRO-RS). All were of European descent. Patients, their parents, or legal representatives gave appropriate informed consents, and the study was approved by the Federal University of Rio Grande do Sul Ethics Committee. Blood samples were collected in tubes with 3.2% sodium citrate, and DNA extraction was performed as described in [10].

Laboratory and statistical tests

The polymorphisms were identified by real time PCR (TaqMan® SNP Genotyping Assay methods – Applied Biosystems, Foster City, USA). Inhibitor titrations were performed using the Bethesda assay [11]. Patients who presented at least once a $>1\text{BU ml}^{-1}$ value were

classified as having inhibitors. Gene and allele frequencies in subjects with and without inhibitors were compared by chi-square and Fisher's exact tests using the SPSS 18.0 program. Haplotypes were estimated with the MLocus software.

Results and discussion

Table 1 shows the genotype frequencies for the 10 polymorphisms tested, one each for interleukin IL4 and its receptor, IL4R, and tumour necrosis factor receptor, TNFR1; while for IL10 and TNF α respectively three and four sites were considered. The frequencies observed were those generally observed in European populations, as shown in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) databank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>). Only two of the 30 tested distributions (with inhibitors, without inhibitors, total) significantly deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium (IL4R 1902A>G and TNF α -863A>C samples in patients with inhibitors), a value that was expected due to random sampling only. The IL10 -1082A>G, -819C>T, and -592A>C; and TNF α -863A>C, -827C>T, -308G>A, and -238A>G polymorphisms were also classified in haplotypes (data not shown, available on request). No significant differences between subjects with or without inhibitors were found either considering the genotype or haplotype frequencies.

Table 2 compares the allele frequencies between patients with and without inhibitors observed in our study with those of previous investigations. As far as we know, the data on IL4R 1902A>G, TNF α -863A>C, and TNFR1 303A>G are the first reported in the literature. Our non-significant differences between the two groups for IL4 -590C>T, IL10 -819C>T, -592A>C, TNF α -827C>T, -238G>A agree with the findings reported in [4, 5, 6]. However the results concerning two other sites are contradictory. For IL10 -1082A>G the absence of association observed by us was found by [7]. On the other hand, Pavlova *et al.* [5] did find a difference, with the G allele showing a higher frequency in subjects with inhibitors. As far as TNF α -308G>A, there are divergent results in the four series. Baffuno *et al.* [7] obtained non-significant data between the two sets, as ourselves, while Pavlova *et al.* [5] and Astermark *et al.* [6] observed higher A frequencies in those with inhibitors. Sample sizes are not very different in the series with divergent results, and all genotype

frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium. All series included severe haemophilia A patients only. Therefore we are at a loss to explain these divergent results; certainly new studies on this specific polymorphism are warranted.

Acknowledgements

Thanks are due to Ana M. C. B. Pereira for laboratory help, as well as to the patients and staff of HEMOCENTRO-RS for agreeing to participate in the study and for logistical support. Financing was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Apoio a Núcleos de Excelência Program).

Disclosures

The authors stated that they had no interests which might be perceived as posing a conflict or bias.

References

1. Ghosh K, Shetty S. Immune response to FVIII in hemophilia A: an overview of risk factors. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2009; **37**: 58-66.
2. Lavigne-Lissalde G, Rothschild C, Pouplard C, Lapaud P, Gruel Y, Schved JF, Granier C. Characteristics, mechanisms of action, and epitope mapping of anti-factor VIII antibodies. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2009; **37**: 67-79.
3. Zhang AH, Skupsky J, Scott DW. Factor VIII inhibitors: risk factors and methods for prevention and immune modulation. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2009; **37**: 114-124.
4. Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, Lefvert AK. Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 2006; **107**: 3167-72.
5. Pavlova A, Delev D, Lacroix-Desmazes S, Schwaab R, Mende M, Fimmers R *et al.* Impact of polymorphisms of the major histocompatibility complex class II, interleukin-10, tumor necrosis factor- α and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A. *J Throm Haemost* 2009; **7**: 2006-15.
6. Astermark J, Oldenburg J, Carlson J, Pavlova A, Kavavli K, Berntorp E, Lefvert AK. Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 2006; **108**: 3739-45.
7. Baffuno 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* 2010; **16**: 469-73.

8. Chaves D, Belisário A, Castro G, Santoro M, Rodrigues C. Analysis of cytokine genes polymorphism as markers for inhibitor development in haemophilia A. *Int J Immunogen* 2010; **37**: 79-82.
9. 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* 2009; **15**: 309-13.
10. 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.
11. Kasper CK. Laboratory tests for factor VIII inhibitors, their variation, significance and interpretation. *Blood Coagul and Fibrin* 1995; **2**:7-10.

Table 1. Genotype frequencies observed in severe haemophilia A patients with and without inhibitor

Systems and genotypes	With inhibitors (N=47)		Without inhibitors (N=107)	
	N	Frequency (%)	N	Frequency (%)
IL4				
-590 C>T				
CC	27	57.4	55	51.4
CT	14	29.8	40	37.4
TT	6	12.8	12	11.2
IL4R				
1902 A>G				
AA	33	70.2	68	63.6
AG	9	19.1	35	32.7
GG	5	10.6	4	3.7
IL10				
-1082 A>G				
AA	21	44.7	43	40.2
AG	19	40.4	51	47.7
GG	7	14.9	13	12.1
-819 C>T				
CC	18	38.3	61	57.0
CT	24	51.1	35	32.7
TT	5	10.6	11	10.3
-592 A>C				
AA	5	10.6	12	11.2
AC	23	48.9	34	31.8
CC	19	40.4	61	57.0

Table 1. (Cont)

Systems and genotypes	With inhibitors (N=47)		Without inhibitors (N=107)	
	N	Frequency (%)	N	Frequency (%)
TNFα				
-863 A>C				
AA	7	14.9	12	11.2
AC	8	17.0	39	36.4
CC	32	68.1	56	52.3
-827 C>T				
CC	37	78.7	87	81.3
CT	10	21.3	20	18.7
-308 G>A				
GG	40	85.1	84	78.5
GA	7	14.9	21	19.6
AA	0	0	2	1.9
-238 A>G				
AA	1	2.1	0	0
AG	5	10.6	13	12.1
GG	41	87.2	94	87.9
TNFR1				
303 A>G				
AA	42	89.4	97	90.7
AG	5	10.6	9	8.4
GG	0	0	1	0.9

Table 2. Comparison between the allele frequencies obtained in the present study with those of previous investigation.

System	N	Allele	MAF		P	Reference
			With inhibitors	Without inhibitors		
IL4						
-590C>T	124	<i>T</i>	0.28	0.31	NS	[4]
	154	<i>T</i>	0.38	0.38	1.000	Present study
IL4R						
1902A>G	154	<i>G</i>	0.20	0.20	1.000	Present study
IL10						
-1082A>G	260	<i>G</i>	0.55	0.43	0.008	[5]
	366	<i>G</i>	0.39	0.39	1.000	[7]
	154	<i>G</i>	0.35	0.36	0.898	Present study
-819C>T	260	<i>T</i>	0.24	0.24	1.000	[5]
	154	<i>T</i>	0.36	0.27	0.104	Present study
-592C>A	260	<i>A</i>	0.24	0.24	1.000	[5]
	154	<i>A</i>	0.35	0.27	0.176	Present study

Table 2. (Cont.)

System	N	Allele	MAF		P	Reference
			With inhibitors	Without inhibitors		
TNFα						
-863A>C	154	<i>A</i>	0.23	0.29	0.333	Present study
-827C>T	123	<i>T</i>	0.09	0.08	NS	[6]
	260	<i>T</i>	0.08	0.13	0.068	[5]
	154	<i>T</i>	0.11	0.09	0.835	Present study
-308G>A	124	<i>A</i>	0.42	0.24	0,003	[6]
	260	<i>A</i>	0.22	0.13	0.011	[5]
	373	<i>A</i>	0.13	0.09	NS	[7]
	154	<i>A</i>	0.07	0.12	0.12	Present study
-238G>A	123	<i>A</i>	0.06	0.05	NS	[6]
	260	<i>A</i>	0.03	0.03	0.805	[5]
	154	<i>A</i>	0.07	0.06	0.802	Present study
TNFR1						
303A>G	154	<i>G</i>	0.05	0.05	1.000	Present study

MAF: Minor allele frequency

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A hemofilia A é uma das doenças hemorrágicas mais frequentes da via intrínseca da cascata de coagulação sanguínea, sendo a segunda doença genética hemorrágica mais frequente na população humana (Dasgupta *et al.*, 2007). O padrão de herança é recessivo ligado ao X, e a doença afeta, aproximadamente, 1 em cada 11.700 nascimentos masculinos no Rio Grande do Sul (Alexandre & Roisenberg, 1985). Cerca de 50% dos indivíduos afetados são hemofílicos graves, apresentando níveis de atividade de Fator VIII no plasma <1% do que os encontrados no plasma de indivíduos normais (Antonarakis *et al.*, 1995). Os hemofílicos graves apresentam sangramentos espontâneos ou após traumas leves frequentes, podendo ocorrer hematúria, epistaxe, melena/hematêmese, bem como hematomas, sangramentos retoperitoniais e intra-articulares (hemartroses), os quais constituem os aspectos mais característicos das formas graves e acarretam muitas dificuldades físicas e psicológicas (Rezende *et al.*, 2005).

A reposição do FVIII é a forma de tratamento mais eficiente, porém uma fração dos pacientes tratados desenvolve anticorpos (inibidores) que neutralizam o FVIII infundido, dificultando a ação terapêutica (Rieger, 1996; Rezende *et al.*, 2005). 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-se os pacientes com todas as formas de hemofilia A (grave, moderada e leve). No Rio Grande do Sul a incidência de inibidores nos hemofílicos graves é de 40% (Leiria *et al.*, 2008). 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 hemofílicos. Para esse propósito, é necessária uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos. Com a identificação de determinantes de risco que influenciam o desenvolvimento de inibidores em um paciente, poder-se-iam identificar perfis diferentes de suscetibilidade, que poderiam ser utilizados para selecionar um tratamento mais adequado para cada um, para diminuir ou abolir a formação de inibidores.

Na tentativa de esclarecer os motivos pelos quais alguns pacientes submetidos à terapia de reposição de Fator VIII desenvolvem inibidores e outros não, foram realizados estudos avaliando a relação entre alguns polimorfismos do sistema imune e o desenvolvimento desses anticorpos; porém, de um modo geral, os resultados das associações são negativos ou, quando positivos, não têm apresentado replicação. No presente trabalho foram estudados 10 polimorfismos em 5 sistemas de importância imunológica (IL4, IL4R, IL10, TNF α e TNFR1), não tendo sido encontrada associação entre qualquer desses polimorfismos e o desenvolvimento de inibidores em hemofílicos A graves.

Considerando-se os dados obtidos nos diferentes estudos, pode-se inferir que outros fatores, como as características do tratamento (tipo e pureza do concentrado de Fator VIII utilizado), a idade de início do tratamento, as doses iniciais do concentrado, a frequência das infusões antes do desenvolvimento do inibidor, a intensidade do tratamento (parcialmente examinadas por Leiria, 2008 para a presente série), bem como o tipo de alteração genética do paciente, as variantes do sistema imune ainda não estudadas, e fatores ambientais de diferente sorte podem ter maior influência no desenvolvimento desses anticorpos.

A presente investigação faz parte de um projeto de longa duração, iniciado há mais de quatro décadas, sobre as hemofilias na população do Rio Grande do Sul. Os estudos continuam, e serão investigados os fatores acima mencionados que podem influir no aparecimento ou não desses anticorpos, mais especificamente: a) o tipo de alteração genética de cada paciente; b) sua história de vida; c) presença ou não de recorrência familiar e eventual concordância na formação de anticorpos; e d) acompanhamento individual ao longo do tempo. Com isto, poder-se-á fornecer novos subsídios à elucidação desse problema, da maior importância tanto acadêmica quanto aplicada. Meta: o direito a uma vida digna e feliz, independentemente da constituição genética específica.

REFERÊNCIAS

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.

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, & 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: 267–272.

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: 924–931.

Astermark J, Oldenburg J, Carlson J, Pavlova A, Kavakli K, Berntorp E, Lefvert AK (2006a) Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 108:3739-3745.

Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, Lefvert AK for the MIBS Study Group (2006b) Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 107:3167-3172.

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.

Astermark J, Lacroix-Desmazes S, Reding MT (2008) Inhibitor development. *Haemophilia* 3:36-42.

Arai N, Nomura D, Villaret D *et al.* (1989) Complete nucleotide sequence of the chromosomal gene for human IL-4 and its expression. *J Immunol* 142:274-282.

Bafunno V, Santacroce R, Chetta M, D'Andrea G, Pisanelli D, Sessa, F, Trotta T, Tagariello G, Peyvandi F, Margaglione M (2010) Polymorphisms in genes involved in autoimmune disease and the risk of FVIII inhibitor development in Italian patients with haemophilia A. *Haemophilia* 16(3): 469-473.

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.

Broze GJ (1995) Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. *Ann Rev Med* 46:103-112.

Cantagrel A, Navaux F, Loubet-Lescoulie P, Nourhashemi F, Enault G, Abbal M, Constantin A, Laroche M, Mazieres B (1999) Interleukin-1 beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 42:1093-1100.

Carlsson KS, Astermark J, Danfield S, Berntorp E (2008) Cost and outcome: comparisons of two alternative bypassing agents for persons with haemophilia A complicated by an inhibitor. *Thromb Haemost* 99:1060-1067.

Castelli EC, Moreau P, Chiromatzo A *et al.* (2009) *In silico* analysis of micro RNAs targeting the *HLA-G* 3' untranslated region alleles and haplotypes. *Hum Immunol* 70:1020-1025.

Chaves D, Belisário A, Castro G, Santoro M, Rodrigues C (2010) Analysis of cytokine genes polymorphisms as markers for inhibitot development in haemophilia A. *Intern J Immunogenetics* 37:79-82.

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* 72:335-341.

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* 82:259-270.

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 risk factors. *Immunology Letters* 110:23-28.

Davie EW & Ratnoff OD (1964) Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 145: 1310-1312.

Djukanovic R (2000) The role of co-stimulation in airway inflammation. *Clin Exp Allerg* 30:S46-50.

Erich HA, Lohman K, Mack SJ, Valdes AM, Julier C, Mirel D, Noble JA, Morahan GE, Rich SS for the Type I Diabetes Genetics Consortium (2009) Association analysis of SNPs in the IL4R locus with type I diabetes. *Genes Immun* 10(Suppl 1):S33-S41.

Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL, Keijsers V, Westendorp RG, Huizinga TW (1998) Interleukin 10 secretion in relation to human IL10 locus haplotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9465-9470.

Fakharzadeh SS & Kazazian HH Jr (2000) Correlation between factor VIII genotype and inhibitor development in haemophilia A. *Semin Thromb Hemost* 26:167-171.

Favier B, LeMaolt J, Rouas-Freiss N, Moreau P, Menier C, Carosella ED (2007) Research on HLA-G: an update. *Tissue Antigens* 69:207-211.

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* 266:8957-8962.

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* 69:1475-1480.

Gill JC (1999) The role of genetics in inhibitor formation. *Thromb Haemost* 82:500-504.

Gitschier J, Wood WI & Goralka TM (1984) Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 312:326-330.

Goudemand J (1999) Treatment of patients with inhibitors: cost issues. *Haemophilia* 5:397-401.

Goudemand J, Rothschild C, Demiguel V *et 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.

Ghosh K & Shetty S (2009) Immune Response to FVIII in hemophilia A: an overview of risk factors. *Allerg Immunol* 37:58-66.

Gringeri A, Mantovani LG, Scalone L, Mannucci PM (2003) Cost of care and quality of life for patients with hemophilia complicated by inhibitors: the COCIS Study Group. *Blood* 102:2358-2363.

Ha E, Yang S, Yoo K, Chung I, Lee M, Bae J, Seo J, Chung J, Shin D (2008). Interleukin 4 receptor is associated with an increase in body mass index in Koreans. *Life Sciences* 82:1040-1043.

HAMSTeRS (Haemophilia A Mutation, Structure, Test And Resource Site), <http://hadb.org.uk> (access on April, 2011).

Harrison GA, Humphrey KE, Jakobsen IB, Cooper DW (1993) A 14bp deletion polymorphism in the HLA-G gene. *Hum Mol Genet* 2:2200.

Hausl C, Ahmad RU, Schwarz HP, Muchitsch EM, Turecek PL, Dorner F, Reipert BM (2004) Preventing restimulation of memory B cells in hemophilia A: a potential

new strategy for the treatment of antibody-dependent immune disorders. *Blood* 104:115-122.

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 haemophilia A. UKHCDO Inhibitor Working Party. *Thromb Haemost* 77:234-237.

Hoffman M & Monroe DM (2001) A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 85:958-965.

Hoffman M (2003) Remodeling the blood coagulation cascade. *J Thromb Thrombolysis* 16:17-20.

Hohmann HP, Remy R, Brockhaus M *et al.* (1989) Two different cell types have different major receptors for human tumor necrosis factor (TNF alpha). *J Biol Chem* 264:14927-14934.

Houssiau FA, Lefebvre C, Vanden Berghe M, Lambert M, Devolagelaer JP, Renauld JC (1995) Serum interleukin 10 titers in systemic lupus erythematosus reflect disease activity. *Lupus* 4:393-395.

Huang D, Zhou Y, Xia SQ, Pirskanen R, Liu L, Lefvert AK (1999a) Markers in the promoter region of interleukin-10 (IL10) gene in myasthenia gravis: implications on diverse effects of IL10 in the pathogenesis of the disease. *J Neuroimmunol* 94:82-87.

Huang D, Pirskanen R, Matell G, Lefvert AK (1999b) Tumour necrosis factor-alpha polymorphism and secretion in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 94:165-171.

Jacquemin MG & Saint-Remy JM (1998) Factor VIII immunogenicity. *Haemophilia* 4:552-557.

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.

Kantarci OH, Schaefer-Klein JL, Hebrink DD *et al.* (2003) A population-based study of IL4 polymorphisms in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 137:134-139.

Kempton CL & White GC (2009) How we treat a hemophilia A patient with factor VIII inhibitor. *Blood* 113:11-17.

Lacroise-Desmazes S, Navarrete A-M, André S, Bayry J, Kaveri SV, Dasgupta S (2008) Dynamics of factor VIII interactions determine its immunology in hemophilia A. *Blood* 112:240-249.

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 Beau MM, Lemons RS, Espinosa R, Larson RA, Arai N, Rowley JD (1989) Interleukin-4 and interleukin-5 map to human chromosome 5 in a region encoding growth factors and receptors and are deleted in myeloid leukemias with a del(5q). *Blood* 73:647-650.

Leiria LB (2008) Estudo de Duas Inversões (Inv 1 e Inv 22) no Gene do Fator VIII e o Desenvolvimento de Inibidores contra o Fator VIII em Hemofílicos A do Tipo Grave no Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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* 15:309-313.

Lillicrap D, Vandendriessche T, High K (2006) Cellular and genetic therapies for haemophilia. *Haemophilia* 12:36-41.

Llorente L, Zou W, Levy Y *et al.* (1995) Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of the human systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 181:839-844.

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* 113:600–603.

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.

Manual de Tratamento das Coagulopatias Hereditárias (2006) Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada, Brasília, DF.

Marcus, AJ & Safier LB (1993) Thromboregulation multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB* 7:516-522.

NCBI (National Center for Biotechnology Information), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (access on April, 2011).

Nilsson IM & Lamme S (1993) On acquired haemophilia A - a survey of 11 cases. *Acta Med Scand* 208:5-12.

Nilsson IM (1994) Factor VIII inhibitor treatment – immune tolerance *Semin Hematol* 31:44-48.

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 of factor VIII. *Thomb Haemost* 77:238-242.

Opal SM & Esmon CT (2003) Bench-to-bedside review: functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis. *Critical Care* 7:23-38.

Ozelo MC, Villaça PR, De Almeida JO, Bueno TM, De Miranda PA, Hart WM, Karamalis M (2007) A cost evaluation of treatment alternatives for mild-to-

moderate bleeding episodes in patients with haemophilia and inhibitors in Brazil. *Haemophilia* 13:462-469.

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

Penner JA (2001) Haemophilic patients with inhibitors to factor VIII or IX: variables affecting treatment response. *Haemophilia* 7:103-108.

Pimentel-Muinos FX, Seed B (1999) Regulated commitment of receptor signalling: a molecular switch for death or activation. *Immunity* 11:783-793.

Rabinovitch A (1994) Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? *Diabetes* 43:613-621.

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* 84:643-652.

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.

Rieger A (1996) Aspectos Genéticos e Epidemiológicos dos Inibidores na Hemofilia A. Dissertação de Mestrado – Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Rieger A & Roisenberg I (1999) Prevalence of factor VIII inhibitors in patients with hemophilia A in Brazil. *Thromb Haemost* 81:475-476.

Rosado S, Rúa-Figueroa I, Vargas JA *et al.* (2008) Interleukin-10 promoter polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus from the Canary Islands. *Intern J Immunogenetics* 35:235.

Rosset C (2010) – Polimorfismos em Genes Envolvidos na Regulação do Sistema Imune e o Risco de Desenvolvimento de Inibidores em Hemofílicos A Graves. Trabalho de Conclusão de Curso, Graduação em Biomedicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Rouas-Freiss N, Kirszenbaum M, Dausset J, Carosella ED (1997) Fetomaternal tolerance: role of HLA-G molecule in the protection of the fetus against maternal natural killer activity. *C R Acad Sci* 320:385–392.

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* 269:11601–11605.

Sallah S (1997) Inhibitors to clotting factors. *Ann Hematol* 75:1-7.

Salviato R, Belvini D, Radossi P *et al.* (2007) F8 gene mutations profile and ITT response in a cohort of Italian haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia* 13:361-372.

Sartor RB (1994) Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology* 106:533-539.

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* 74:1618–1626.

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.

Scassellati C, Zanardini R, Squitti R *et al.* (2004) Promoter haplotypes of interleukin-10 gene and sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 356:119.

Scharrer I, Bray GL, Neutzling O (1999) Incidence of inhibitors in haemophilia A patients - a review of recent studies of recombinant and plasma-derived factor VIII concentrates. *Haemophilia*:145–154.

Shibata N, Ohnuma T, Takahashi T *et al.* (2002) The effect of IL4 +33C/T polymorphism on risk of Japanese sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 323:161-163.

Siminovitch KA (2004) *PTPN22* and autoimmune diseases. *Nature Genet* 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* 81:829-834.

Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS *et al.* (1991) The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9292-9296.

Ter Avest PC, Fischer K, Mancuso ME, Santagostino E, Ywste VJ, van den Berg HM, van der Bom JG (2008) Risk stratification for inhibitor development at first treatment for severe hemophilia A: a tool for clinical practice. *J Thromb Haemost* 6:2048-2054.

Tew J, Engel D, Mangan D (1989) Polyclonal B-cell activation in periodontitis. *J Periodontal Res* 24:233-241.

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.

Tizzano EF, Cornet M, Baiget M (2003) Inversion of intron 1 of the factor VIII gene for direct molecular diagnosis of hemophilia A. *Hematologica* 88: 118-120.

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.

Valle Y, Padilla-Gutiérrez JR, Torres-Carrillo NM *et al.* (2010) The -383A>C TNFR1 polymorphism is associated with soluble levels and clinical activity in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 30:655-659.

Van Kampen C, Gauldie J, Collins SM (2005) Proinflammatory properties of IL4 in the intestinal microenvironment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288:G111-117.

Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10:45-65.

Wallache D, Varfolomeev EE, Malinin NL *et al.* (1999) Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 17:331-367.

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.

White GC (2008) Prediction of inhibitors in hemophilia. *J Thromb Haemost* 6:2045-2047.

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.

Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AL, Duff GW (1992) Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1:353.

Xanthoulea S, Pasparakis M, Kousteni S *et al.* (2004) Tumor necrosis factor (TNF) receptor shedding controls thresholds of innate immune activation that balance opposing TNF functions in infection. *J Exp Med* 3:367-376.

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 C, Huang D, Liu L *et al.* (2001) Interleukin-10 gene promoter polymorphisms in the multiple myeloma. *Int J Cancer* 95:184-188.

Zhou Y, Giscombe R, Huang D, Lefvert AK (2002) Novel genetic association of Wegener's granulomatosis to the interleukin-10 gene. *J Rheumatol* 29:317-320.