

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E
FISIOPATOLOGIA

JOSIANE BAZZO DE ALENCAR

ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS E O
DESENVOLVIMENTO DE INIBIDORES NA HEMOFILIA A

Maringá
2013

JOSIANE BAZZO DE ALENCAR

ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS E O
DESENVOLVIMENTO DE INIBIDORES NA HEMOFILIA A

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências e Fisiopatologia.

Área de concentração: Biociências e Fisiopatologia Aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof.^a Dr.^a Jeane Eliete Laguila Visentainer

Co-Orientador: Prof.^a Dr.^a Ana Maria Sell

Maringá
2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

JOSIANE BAZZO DE ALENCAR

ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS E O DESENVOLVIMENTO DE INIBIDORES NA HEMOFILIA A

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências e Fisiopatologia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^ª Dr^ª Jeane Eliete Laguila Visentainer
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^ª Dr^ª Margareth Castro Ozelo
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. José Francisco Comenalli Marques Júnior
Universidade Estadual de Campinas

Prof^ª Dr^ª Luiza Tamie Tsuneto
Universidade Estadual de Maringá

Prof^ª Dr^ª Daniela Maira Cardozo
Universidade Estadual de Campinas

Aprovada em: 02 de dezembro de 2013

Local de defesa: Bloco T-20, sala 112B, *campus* da Universidade Estadual de Maringá

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que contribuíram para a sua realização.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela sabedoria e inspiração.

À minha família que me deu todo o suporte para alcançar meus objetivos.

Ao meu marido, Guilherme, pelo incentivo e compreensão.

Aos técnicos, professores e alunos do laboratório de Imunogenética da UEM (LIG-UEM), meus sinceros agradecimentos.

Às amigas e amigos que conquistei desde o início no LIG-UEM: Camila, Luciana, Pâmela, Joana, Ana Paula, Renata, Hugo e Everton.

À minha coorientadora, que não negou esforços em me ajudar todas as vezes que me surgiram dúvidas, que me deu a confiança e abriu portas no LIG-UEM.

E principalmente à minha orientadora, Prof^a Jeane, toda a minha gratidão. Muito obrigada pela confiança e pelas oportunidades oferecidas. Obrigada pela paciência e pelos sábios ensinamentos durante estes dois anos.

EPÍGRAFE

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

Associação de polimorfismos em genes de citocinas e o desenvolvimento de inibidores na hemofilia A

RESUMO

A Hemofilia A (HA) é uma doença hereditária recessiva ligada ao cromossomo X causada pela deficiência do fator VIII (FVIII) da coagulação sanguínea. Estima-se que há aproximadamente 10.065 portadores de HA no Brasil. A base do tratamento da HA é a administração de concentrado de FVIII derivado do plasma ou de produto recombinante. Alguns pacientes desenvolvem anticorpos que neutralizam a atividade do FVIII infundido, definidos como inibidores de FVIII, reduzindo a eficácia do tratamento e comprometendo a hemostasia. Vários fatores podem ter o potencial de influenciar este processo, inclusive os genes da resposta imune. Polimorfismos em regiões regulatórias de genes de citocinas estão sendo estudados em associação ao risco de desenvolvimento de inibidores em pacientes com HA. Alguns estudos mostraram que os principais polimorfismos relacionados ao aumento do risco de desenvolver inibidores estão nos genes *TNF* e *IL10*. A identificação desses fatores genéticos, em especial genes de citocinas, envolvidos na produção de inibidores por pacientes hemofílicos poderá auxiliar na prevenção do efeito inibitório ao FVIII. Dessa forma, este estudo teve por objetivo analisar os polimorfismos em regiões regulatórias de genes de citocinas que poderiam estar associados ao risco de desenvolvimento de inibidores do FVIII em indivíduos com HA no Estado do Paraná. Pacientes com HA registrados no Hemovidaweb Coagulopatias do Paraná foram selecionados para o estudo. A genotipagem de citocinas foi realizada pela técnica PCR-SSP utilizando o kit de citocinas Invitrogen®. Os resultados indicaram aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento de inibidores em pacientes com o alelo +874T e genótipo +874TT no gene *INFG*; e para o genótipo +869TT no *TGFβ1*. No entanto, os pacientes com o alelo +874A no gene *INFG*; alelo +1902A no *IL4RA*; e haplótipo CG no *TGFβ1* apresentaram menor risco de desenvolver inibidores. Este estudo auxilia a identificação de genes promissores à prática clínica, além de contribuir para traçar um perfil genético dos pacientes com HA gravemente afetados.

Palavras-chave: hemofilia A, inibidores, polimorfismos, genes de citocinas.

Association of polymorphisms in genes of cytokines and the development of inhibitors in Hemophilia A

ABSTRACT

Hemophilia A (HA) is a hereditary recessive disease X-linked caused by a deficiency of factor VIII (FVIII) blood clotting. It is estimated that there are approximately 10,065 patients with HA in Brazil. The basis of treatment of HA is the administration of concentrate of FVIII plasma-derived or recombinant product. Some patients develop antibodies that neutralize the activity of FVIII infused, defined as FVIII inhibitors, thus reducing the treatment efficiency and compromising hemostasis. Several factors may have the potential to influence this process, including immune response genes. Polymorphisms in regulatory regions of cytokine genes are being studied in association with risk of development of inhibitors in patients with HA. Studies have shown that the main polymorphisms associated with an increased risk of developing inhibitors are in the genes *IL10* and *TNF*. The identification of these genetic factors, in particular cytokine genes, involved in the production of inhibitors by hemophiliacs patients may assist in preventing the inhibitory effect of FVIII. Therefore, this study analyzed the polymorphisms in regulatory regions of cytokine genes that could be associated with the risk of inhibitors development in patients with HA in the State of Paraná. The HA patients registered in Hemovida web-Coagulopathies in Paraná were selected to the study. Cytokine genotyping was performed by PCR-SSP kit cytokines using the Invitrogen®. The results indicated increased susceptibility to inhibitors development in patients with the +874T allele and +874TT genotype in gene *INFG*; and +869TT genotype in *TGFβ1*. However, patients with the +874A allele of the gene *INFG*; the allele +1902A in *IL4RA*; and CG haplotype in the *TGFBI* are lower risk to develop inhibitors. This study assists to identify promising genes to clinical practice, as well as contributing to trace a genetic profile of patients HA severely affected.

Keywords: hemophilia A, inhibitors, polymorphisms, cytokine genes.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas das publicações científicas: *Haemophilia* (artigo 1)
Disponível em: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-2516/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-2516/homepage/ForAuthors.html) e *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* (artigo 2)
Disponível em: <http://www.rbhh.org/instrucoes-ao-autores/>

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	11
Hemofilia.....	11
O FVIII.....	11
O gene do FVIII e a biossíntese do FVIII humano.....	12
Tratamento da HA.....	15
Desenvolvimento de inibidores em indivíduos com HA.....	15
Ativação da resposta imune ao FVIII.....	16
Bases moleculares para a formação de inibidores.....	18
Fatores não genéticos que podem influenciar o desenvolvimento de inibidores.....	19
Fatores genéticos que podem influenciar o desenvolvimento de inibidores.....	20
Histórico familiar de inibidores em pacientes com HA.....	20
Mutações no gene do FVIII.....	21
Genes de citocinas.....	22
Gene <i>TNF</i>	23
Gene <i>IL10</i>	24
Outros SNPs.....	25
Justificativa.....	26
Objetivos.....	26
Referências Bibliográficas.....	27
Capítulo II.....	33
Associations: <i>IL4RA</i> , <i>INFG</i> , <i>TGFBI</i> genes and the inhibitor development in severe haemophilia A.....	33
Importance of immune response gene in hemophilia A.....	47
CAPÍTULO III.....	67
Conclusões.....	67
Perspectivas futuras.....	67

CAPÍTULO I

HEMOFILIA

A Hemofilia é uma doença hereditária recessiva ligada ao cromossomo X causada pela deficiência parcial ou total dos fatores de coagulação VIII (Hemofilia A, #306700) e IX (Hemofilia B, #306900). A hemofilia se estende a nível mundial, e estima-se que a prevalência de indivíduos com hemofilia A é de aproximadamente um em cada 10.000 homens e a da hemofilia B, um em 50.000 homens [1, 2].

Em 2010, a Federação Mundial de Hemofilia estimou cerca de 400.000 portadores de hemofilia no mundo. No mesmo ano, foram registrados aproximadamente 10.065 pacientes hemofílicos no Brasil, sendo a hemofilia A a mais comum ao representar 80% dos casos [3].

O FVIII

O FVIII é uma glicoproteína que atua na coagulação sanguínea como cofator para o fator IX ativado (FIXa) na ativação do fator X (FX) [4]. O FXa promove a conversão de protrombina em trombina, que cliva o fibrinogênio em fibrina para a formação de coágulo sanguíneo em local de sangramento (Figura 1). A deficiência ou disfunção do FVIII, não permite a formação de coágulo no local de uma lesão. O FVIII é sintetizado no fígado, e circula no sangue associado ao Fator de *Von Willebrand* (FVW) que o estabiliza e protege da degradação proteolítica, e promove a sua concentração no sítio da lesão [5, 6].

Os níveis plasmáticos normais de FVIII variam de 0,4 UI/mL a 1,5 UI/mL e sua atividade coagulante (C) é de 100%. As diferentes mutações no gene do FVIII podem levar à deficiência ou anormalidade desse fator, representando a gravidade da doença e permitindo uma classificação fenotípica em hemofilia *grave* (nível do FVIII < 0,01 UI/mL ou C < 1%), *moderada* (nível de FVIII entre 0,01 – 0,05 UI/mL ou C entre 1% a 5%) e *leve* (FVIII > 0,05 - < 0,40 UI/mL e C > 5% a < 40%) [7, 8].

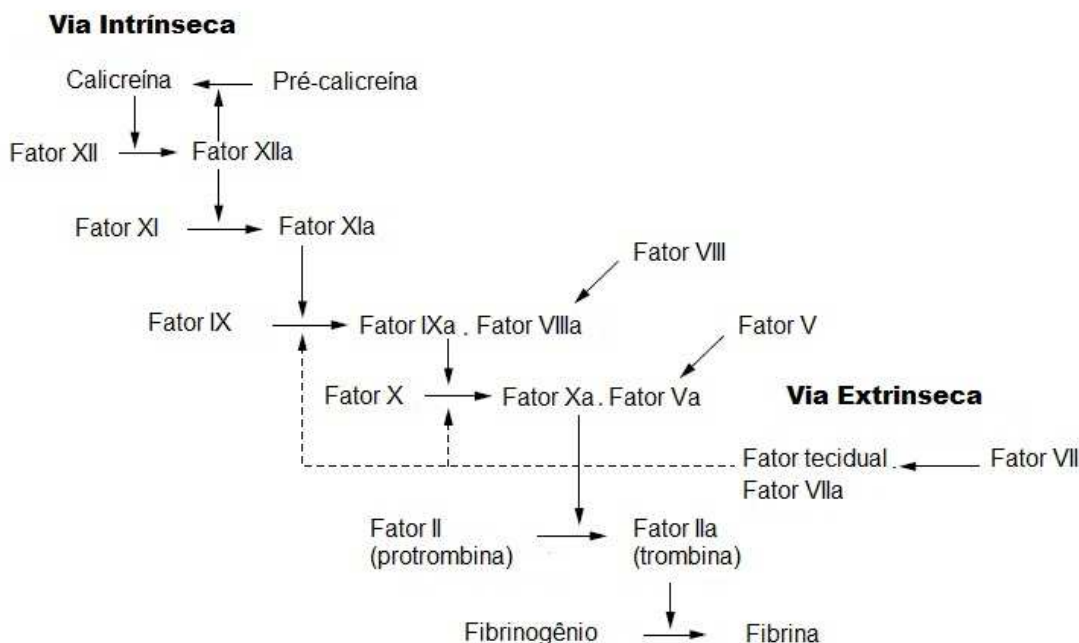


Figura 1. Representação esquemática da cascata de coagulação. A deficiência no FVIII impede a ativação do FX e conseqüentemente a formação da fibrina, resultando em comprometimento da coagulação do sangue. Adaptado de: Bowen *et al.*, 2002 [9].

O GENE DO FVIII E A BIOSÍNTESE DO FVIII HUMANO

O gene do FVIII (#305423, #305424) está localizado na porção distal do braço longo do cromossomo X (Xq28) e possui 186 Kb de DNA genômico. Ele apresenta 26 éxons que codificam uma proteína de 2.332 aminoácidos (figura 2A e 2B) [10].

A maturação e a secreção do fator FVIII envolvem uma grande variedade de interações e modificações pós traducionais [11]. A proteína em sua forma nativa consiste em domínios A1-A2-B-C1-C2 e porções amino e carboxi-terminais [12]. No retículo endoplasmático, o FVIII sofre vários eventos de glicosilação para depois ser encaminhado ao complexo de Golgi. Neste, a molécula sofre um processo de sulfatação e glicosilação de resíduos específicos, além de clivagens proteolíticas na junção dos domínios B-A3 e em sítios adicionais dentro do domínio B [11]. Estas clivagens dividem a molécula de fator VIII em duas porções: cadeia pesada, que consiste nos domínios A1 (1-336), A2 (373 -719) e B (741-1648); e a cadeia leve, composto pelos domínios A3 (1690-2019), C1 (2020 -2172) e C2 (2173-2332). Entre os domínios A1 e

A2, região C-terminal de A2 e N-terminal de A3, há uma elevada proporção de resíduos de carga negativa, chamada de regiões ácidas a1 (337–372), a2 (720–740) e a3 (1649–1689), respectivamente (figura 3A)[13]. OFVIII secretado é um heterodímero, cujas cadeias se mantêm ligadas por meio de interações não covalentes entre os domínios A1 e A3, juntamente a íons Ca^{+2} (Figura 2C) [14].

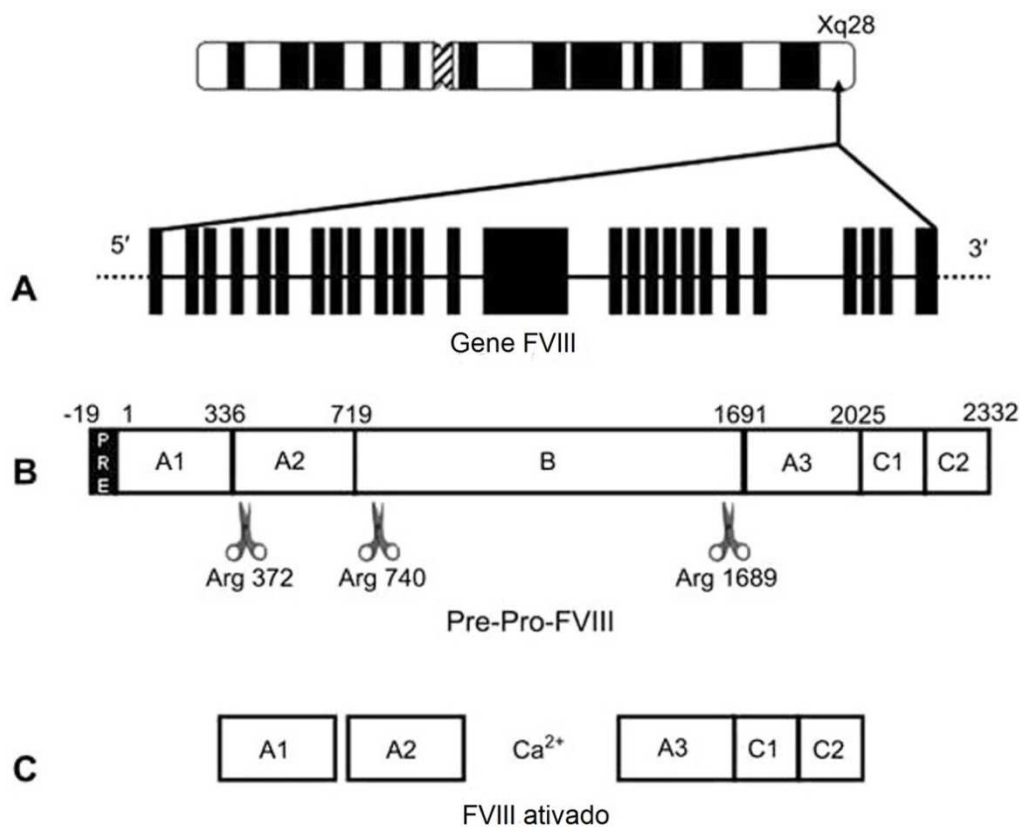


Figura 2. Gene e estrutura da molécula do FVIII. Adaptado de: Castaldo et al., 2007 [15].

Após a secreção do FVIII, o heterodímero interage com o FVW que atua como carreador do FVIII durante sua circulação no plasma. Essa ligação impede a formação do complexo ligado à membrana antes da ativação do FVIII e também protege o FVIII da inativação pela proteína C ativada, FIXa e FXa [13]. Além disso, essa interação aumenta a estabilidade do FVIII para uma meia vida que varia entre 12-16 horas e favorece a clivagem do FVIII pela trombina [16].

O FVIII é ativado pela trombina e pelo FX. Ambas as proteases clivam a molécula FVIII nas posições Arg^{372} e Arg^{740} da cadeia pesada e Arg^{1689} da cadeia leve. Essas clivagens resultam em dois fragmentos A1-A2 e A3-C1-C2 que permanecem associados por meio de interações eletrostáticas entre o domínio A1 e A3 (Figura 3B)

[17]. A ativação do FVIII reduz drasticamente a afinidade com o FVW. O FVIII ativado (FVIIIa) juntamente com FIXa, fosfolípidos de membrana carregados negativamente e íons cálcio formam o complexo tenase, que por sua vez, atua enzimaticamente sobre o FX convertendo-o em sua forma ativada. O FXa participa da conversão da protrombina em trombina juntamente com fator V ativado (FVa) e íons cálcio (complexo protrombinase). A trombina é a enzima chave da cascata de coagulação que, em última instância, converterá fibrinogênio em fibrina (Figura 1). Uma vez que o FVIII ativado tenha desempenhado seu papel na cascata da coagulação, este é rapidamente inativado. O mecanismo exato desta inativação, sob condições fisiológicas, ainda é desconhecido. Entretanto, a proteína C ativada cliva a cadeia pesada do FVIII nas posições Arg³³⁶/Met³³⁷ e Arg⁵⁶²/Gly⁵⁶³ em uma reação que requer a presença de proteína S e a região carboxi-terminal do domínio B do FV [13, 18].

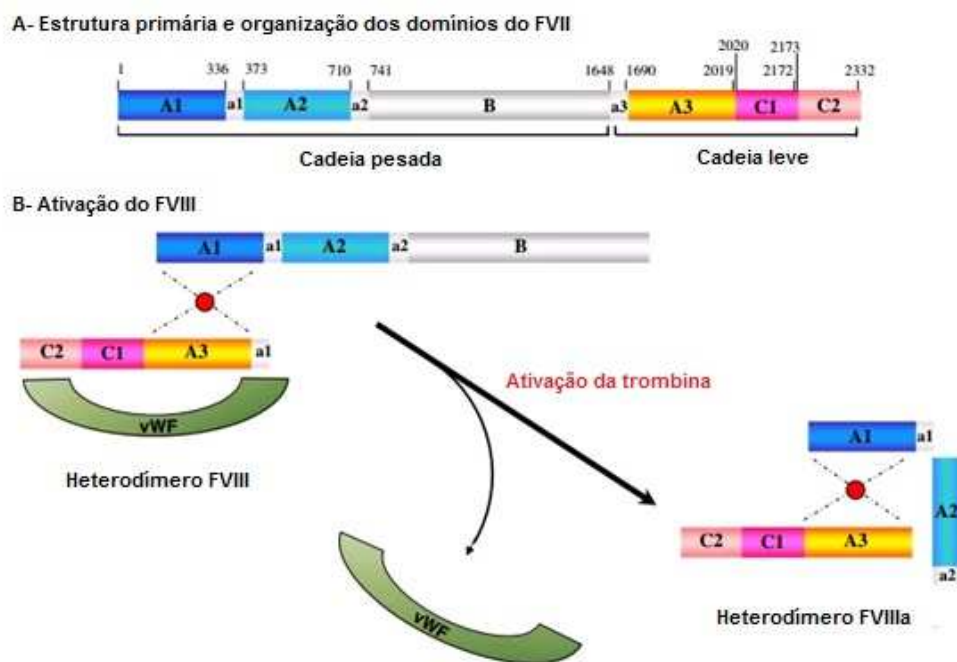


Figura 3. A-Estrutura da molécula do FVIII e sua organização em domínios. B- Ativação da molécula FVIII. Adaptado de: Lavigne-Lissalde *et al.*, 2009.

TRATAMENTO DA HA

O tratamento da HA está disponível como concentrado de FVIII derivado do plasma e de produto recombinante. O FVIII plasmático é produzido a partir do fracionamento do plasma e inativação de partículas virais. Apesar da similaridade, este produto pode ter diferença na pureza. Concentrados de pureza intermediária contêm níveis de FVW, enquanto que produtos de elevada pureza são desprovidos de FVW [19]. Além disso, alguns procedimentos de inativação viral podem afetar a estrutura da molécula e contribuir para a produção de inibidores contra o FVIII modificado. Os concentrados de FVIII recombinante são produzidos por expressão de vetores que transportam o gene do FVIII humano em linhagens celulares. Assim como os produtos derivados do plasma podem apresentar diferenças, os produtos recombinantes também podem exibir diferenças que podem ser desde a linhagem celular utilizada, ao comprimento do gene e a formulação do produto [20].

DESENVOLVIMENTO DE INIBIDORES EM INDIVÍDUOS COM HA

Os anticorpos, também chamados de inibidores, são imunoglobulinas de alta afinidade pertencentes em sua maioria da classe G (IgG), subclasses IgG1 e IgG4 [21]. Alguns estudos indicam a predominância da subclasse IgG4 [21, 22]. A predominância das moléculas IgG4 pode ser resultado de administrações repetidas de FVIII necessárias para manter os níveis de FVIII plasmático e uma hemostasia normal [23]. Com isso, os anticorpos neutralizam a atividade do FVIII infundido, e conseqüentemente, reduzem a eficácia do tratamento [22]. Estudos têm mostrado que a incidência de inibidores em pacientes hemofílicos é de 5 a 7%, e a incidência de inibidores em pacientes com HA grave é substancialmente maior, entre 12 e 13% [24].

O método padrão para a quantificação de inibidores do FVIII no plasma é pelo método Nijmegen, uma modificação do ensaio Bethesda [25]. A unidade Bethesda (UB) é definida como uma quantidade de anticorpos do plasma que neutraliza 50% da atividade do FVIII plasmático [26]. Títulos iguais ou maiores que 0,6 UB são considerados inibidores positivos [8].

Os inibidores do FVIII são classificados como sendo de alta ou baixa resposta, dependendo da estimulação do sistema imune após várias exposições ao fator. Se a reação do sistema imune é rápida e intensa, a quantidade de anticorpos contra o FVIII aumenta, atingindo um nível maior ou igual a 5 UB. Este tipo de inibidor é classificado como sendo de alta resposta. Já quando o sistema imune produz uma resposta mais demorada e fraca, o título de anticorpo permanece baixo, geralmente inferior a 5 UB. Este tipo de inibidor é classificado como sendo de baixa resposta [27].

O tratamento de pacientes que desenvolvem inibidores é um desafio e baseia-se no uso de agentes que geram trombina, independente da ação do FVIII ou FIX, e são chamados de agente *bypassing*. Os agentes *bypassing* mais utilizados são o complexo de concentrado de protrombina ativado (CCPA) e o fator VII recombinante ativado (rFVIIa). Apesar de sua eficácia no controle de maior parte dos episódios de sangramento, o tratamento com estes agentes apresentam várias limitações em comparação ao tratamento de indivíduos hemofílicos sem inibidor. Quando o tratamento é frequente, pode causar excesso de sangramento ou trombose. O fato de estes produtos conterem quantidades mesmo que pequenas de FVIII e maiores de FX pode estimular a produção de novos anticorpos contra o FVIII infundido. Devido ao tempo de meia vida curto dos agentes, a profilaxia regular não é possível, além de terem um custo elevado [27].

ATIVAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE AO FVIII

Os pacientes que entram em contato pela primeira vez com o FVIII infundido, podem iniciar uma resposta contra ele envolvendo células do sistema imune. O baço é um órgão que desempenha um papel importante na estimulação inicial da resposta imune humoral, pois é o local de passagem de antígenos provenientes do sangue. A polpa branca do baço é rica em células dendríticas (DC), macrófagos e células B da zona marginal. A localização dessas células facilita o acesso imediato aos antígenos circulantes no sangue [28]. O FVIII infundido também pode ser capturado no local do sangramento e ser transportado aos órgãos linfóides secundários (baço, linfonodos) para a apresentação às células TCD4⁺naïves. O sangramento e o processo de coagulação ativam a síntese de citocinas proinflamatórias e quimiocinas [29]. Neste local, células da

imunidade inata e células apresentadoras de antígenos (CAAs) são atraídas e emitem sinais de ativação para endocitose do FVIII. O FVIII é endocitado em vesículas onde é clivado proteoliticamente em peptídeos. Moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) de classe II são formadas no retículo endoplasmático e são deslocados à vesícula onde estão os peptídeos [30]. Cada molécula MHC permite a ligação de um único peptídeo. Após esta ligação, o complexo peptídeo-MHC é transportado até superfície da CAA, onde ocorre a interação com o receptor de células T (TCR) do linfócito TCD4⁺ específico. A apresentação do antígeno requer uma segunda interação, que ocorre entre a molécula CD80/86 da CAA e a molécula CD28 da célula T [30, 31]. Na presença de ambos os sinais, ocorre ativação do linfócito T, que pode ser tanto uma ativação da célula T helper 1 (Th1), responsável pela secreção de citocinas importantes na imunidade celular como interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina-2 (IL-2), assim como a ativação da célula T helper 2 (Th2) que secreta interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), entre outras, importantes na imunidade humoral; e, também ocorre aumento da expressão dos CD2, CD30, CD40L e CD28 na superfície da célula T CD4⁺ [28, 32, 33]. Essas citocinas quando secretadas pelas células Th1 ou Th2 estimulam a diferenciação dos linfócitos B em células plasmáticas produtoras de anticorpos, os quais trocam o isótopo da imunoglobulina e produzem os anticorpos específicos contra o FVIII no plasma (Figura 4) [32, 34].

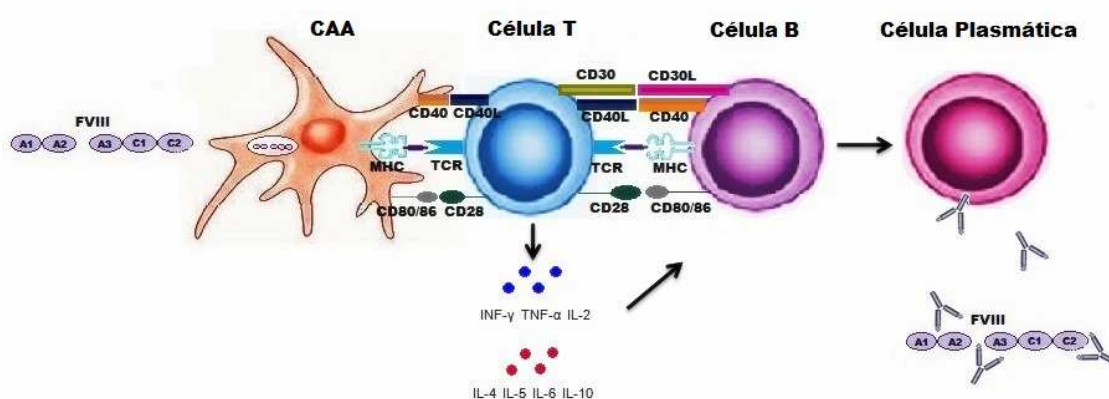


Figura 4. Produção de anticorpos específicos contra o FVIII. O FVIII, por ser um antígeno exógeno, é endocitado pelas CAAs, processado e apresentado aos linfócitos TCD4⁺ via MHC de classe II. O reconhecimento do peptídeo pelas células T requer a interação do receptor específico das células T (TCR), e de sinais co-estimulatórios, tais como: CD40 e CD40 ligante (CD40L), CD80/86 e CD28 ou

CTLA4. Em resposta ao antígeno, os linfócitos T ativados liberam citocinas, e expressam moléculas de superfície (CD30, CD28, CD40L) que interagem com as proteínas de superfície correspondentes (CD30 ligante, CD80/86, CD40) dos linfócitos B. Isso faz com que haja ativação e diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos produtores de anticorpos anti-FVIII e em células B de memória. Fonte: Adaptado de: Oldenburg *et al.*, 2006 [35].

Os domínios A2, A3 e C2 são as regiões as quais os anticorpos anti-FVIII podem reagir e influenciar o funcionamento adequado da cascata de coagulação [36, 37]. Estudos tem mostrado que em pacientes que apresentam mutações *missense* nos domínios A2 e C2, o risco de inibidor é quatro vezes maior do que em pacientes com mutações fora desta região [32]. Os anticorpos anti-A2 e em alguns casos de anti-C2, por exemplo, podem interagir com os domínios A2 e C2, respectivamente, e neutralizar a atividade pró-coagulante do FVIII [37]. O domínio C2, no entanto, é afetado por anticorpos anti-C2 os quais impedem que o FVIII se ligue aos fosfolipídeos e ao FwW [38]. E os anticorpos anti-A3 têm como alvo o domínio A3 que impede a interação do FIX ao FVIII ativado [39].

Quando há a presença do FVIII endógeno, o FVIII é tolerado imunologicamente, ou seja, a resposta imune não é estimulada. Isso é atribuído a um tipo de tolerância imune central, que ocorre durante o desenvolvimento, quando células epiteliais tímicas apresentam os antígenos e uma seleção negativa exclui as células T de alta-afinidade, prevenindo a existência dessas células no sistema imune periférico. Por outro lado, pacientes hemofílicos A terão células T de alta afinidade específica ao FVIII no sistema periférico e quando esses pacientes receberem infusões de FVIII, o sistema imune reconhecerá como um antígeno estranho e isso desencadeará o evento adverso. No entanto, isso não explica porque a maioria dos hemofílicos A não desenvolvem inibidores [40].

BASES MOLECULARES PARA A FORMAÇÃO DE INIBIDORES

A razão pela qual ocorre o desenvolvimento de inibidores em apenas alguns dos pacientes hemofílicos tem sido discutida. Vários fatores podem ter o potencial de influenciar este processo, como os fatores genéticos e os fatores ambientais [41]. Os

ambientais incluem aqueles não relacionados ao tratamento, como frequência, local e intensidade do sangramento, e eventos intercorrentes incluindo cirurgia e trauma; e fatores relacionados ao tratamento [42]. Os fatores genéticos incluem o genótipo, raça, história familiar, e a presença de genes de resposta imune [43, 44].

FATORES NÃO GENÉTICOS QUE PODEM INFLUENCIAR O DESENVOLVIMENTO DE INIBIDORES

Na presença de condições de risco, como sangramentos graves, trauma, ou cirurgia com intenso dano tecidual, as proteínas exógenas (altas doses e/ou tratamento prolongado) são intensamente apresentadas aos linfócitos T e B em presença de sinais regulatórios. Por outro lado, quando em caso de profilaxia, onde não há condições de risco, ocorre exposição regular de doses menores de antígenos, a qual pode haver indução de tolerância a proteínas estranhas [45].

Alguns estudos revelaram que em cirurgia ou exposição prolongada (5 dias ou mais) ao FVIII no primeiro tratamento, e altas doses de FVIII (≥ 50 IU/Kg) durante os primeiros 50 dias de exposição ao FVIII exógeno, há aumento de 2 a 3 vezes no risco de desenvolver o inibidor. Além disso, há aumento do risco em pacientes que apresentavam menor idade ao receber as primeiras exposições [45, 46].

Quanto ao tratamento, estudos investigaram o risco de desenvolver inibidor frente ao produto derivado do plasma (pFVIII) e ao recombinante (rFVIII) [47-49]. Um estudo de multicentros na França acompanhou 148 pacientes previamente não tratados com HA grave. Destes, 62 foram tratados com pFVIII e 86 com rFVIII. Os pacientes tratados com pFVIII tinham acompanhamento mais longo e receberam maior quantidade de infusões do que os tratados com rFVIII. Durante o período de observação, 34 (23%) de 148 indivíduos desenvolveram inibidor: 7 (11%) de 62 tratados com pFVIII e 27 (30%) de 86 com rFVIII. Altos títulos de inibidores foram observados em 16 pacientes, 3 tratados com pFVIII e 13 com rFVIII [47]. Outro estudo na Inglaterra não verificou diferença significativa entre os diferentes tratamentos para o risco de desenvolver inibidor [50]. Alguns autores afirmam que o rFVIII deve ser o tratamento de escolha devido ao baixo risco de transmissão de patógeno e que futuramente será mais favorável do ponto de vista econômico [51]. Ainda há muita contradição em relação ao risco e ao tratamento; por isso, os autores ressaltam a

necessidade de estudos randomizados a fim de uniformizar os dados do inibidor com a fonte de FVIII [49].

FATORES GENÉTICOS QUE PODEM INFLUENCIAR O DESENVOLVIMENTO DE INIBIDORES

HISTÓRICO FAMILIAR DE INIBIDORES EM PACIENTES COM HA

A etnia e o histórico familiar foram associados à predisposição ao desenvolvimento de inibidores. Pacientes com história familiar de presença de inibidores têm risco de 5,8 a 6,3 vezes maior de desenvolver inibidores, do que pacientes hemofílicos sem história familiar [52]. Um estudo revelou que americanos com descendência africana apresentavam um risco maior de desenvolvimento de inibidores [52]. Essa associação e a relação histórica de inibidor na família também foram observadas em um estudo do grupo The Malmö International Brother Study (MIBS). Os resultados mostraram que a incidência de inibidores encontrava-se elevada no subgrupo de pessoas com descendência africana, quando comparado ao grupo caucasóide (55,6% vs.27,4%). Foi observado também, que o risco para a formação de inibidor aumentava significativamente em pacientes com história familiar de inibidores; o risco absoluto para o desenvolvimento de inibidores em famílias com história prévia era de 48% (95%, IC=35-62%), enquanto que o risco em famílias com nenhum histórico familiar de inibidor era de 15% (95%, IC=11-21%) [53].

Em outro estudo do mesmo grupo avaliaram a possibilidade de mutações genéticas influenciarem a formação de inibidores em indivíduos da mesma família. Foram analisadas 113 famílias, sendo dois ou mais irmãos com hemofilia grave, a maioria caucasóide. Em 59 famílias, todos os irmãos desenvolveram inibidores e 25 (42,4%) destas, havia história familiar de desenvolvimento do inibidor. Verificou-se também, que o tipo de mutação no gene do FVIII mais frequente entre as famílias foi a inversão no íntron 22. Os inibidores foram descritos em 45 das 74 famílias (60,8%) com este tipo de mutação; e entre as 45, 18 (40%) de todos os irmãos desenvolveram o inibidor [32].

Desta forma, fica evidente a existência de predisposição genética ao desenvolvimento do inibidor [53]. Os fatores não genéticos parecem influenciar a

resposta imune e, conseqüentemente, alterar o risco de desenvolver inibidores em cada família. No entanto, pode haver alterações na resposta imune, baseadas tanto em marcadores genéticos como não genéticos [32].

MUTAÇÕES NO GENE DO FVIII

O fator genético melhor estabelecido entre os pesquisadores, quanto ao risco de aloimunização, é o tipo de mutação no gene do FVIII [54, 55]. Esta variável contribui para a diferença estrutural entre uma proteína FVIII endógena normal e proteína exógena proveniente da terapia de reposição. A proteína exógena neste caso é imunogênica, ou seja, reconhecida como estranha ao organismo e ativa o sistema imune específico [32].

O gene do FVIII contém polimorfismos de relevância clínica, no contexto das doenças hereditárias, que podem ser utilizados para investigar um gene afetado em uma dada família. Estes estudos de ligação têm permitido a análise do estado do portador e o diagnóstico pré-natal da hemofilia [56]. Mutações de ponto, deleções, inserções, inversões e rearranjos são comuns no gene do FVIII [9, 57, 58].

As deleções são o segundo defeito mais comum no gene do FVIII e afeta, aproximadamente, 5 a 10% dos pacientes. Inserções, rearranjos/inversões são menos frequentes na população hemofílica, com exceção da inversão no íntron 22 e íntron 1 que são predominantes entre pacientes HA graves [9,59]. Ambas as inversões são mediadas por recombinações intracromossômicas entre sequências do íntron 22 e cópias extragênicas altamente homólogas; similarmente, sequências do íntron1 (intracromossômicas) e cópias extragênicas sofrem recombinação [35].

No estudo de coorte realizado por Gouw e colaboradores, 318 pacientes com HA graves foram analisados. A incidência de inibidores foi de 18% (35/200) em genes com mutações de alto risco (67% grandes deleções, 30% mutações *nonsense*, 15% inversões no íntron1 ou 22), e 7% (8/118) em genes com mutações de baixo risco (7% pequenas deleções, 6% mutações *missense*, 8% mutações *splice site*). Além disso, entre os pacientes que apresentaram mutações de ponto, o risco de desenvolver inibidor foi maior nos que tiveram a mutação nos domínios A3 (13%) e C2 (17%) [58].

Em outro estudo realizado com 1104 pacientes com HA, erros de *splicing* apresentaram maiores frequências em pacientes com HA graves que desenvolveram

inibidor. Outras mutações como inversões do íntron1 e íntron 22, mutações *nonsense* e grandes deleções também foram frequentes. Mutações *missense* e pequenas deleções ou inserções estavam menos frequentes. Assim como o estudo anterior, mutações na cadeia leve foram associadas a um maior risco de desenvolver o inibidor em comparação às mutações na cadeia pesada (27% vs. 14%) [60].

No Brasil, inversões no gene do FVIII foram encontradas em 13 de 21 pacientes com HA grave (62%) [61]. A recombinação no íntron 22 do gene do FVIII com a cópia distal do F8A foi detectada em 8 casos e com a cópia proximal em 4 casos. Dois dos pacientes com HA grave apresentavam altos títulos de inibidores e o rearranjo com a cópia distal do gene F8A, inferindo que o risco de desenvolvimento de inibidores em pacientes pode estar relacionado com este tipo de rearranjo.

Um estudo de meta-análise observou que o risco de desenvolver inibidor em pacientes com grandes deleções e mutações *nonsense* é maior do que em pacientes com inversão no intron 22 (OR: 3,6 e OR: 1,4; respectivamente). O risco de desenvolver inibidor em pacientes com inversão no intron1 e mutações *splice-site* foi praticamente o mesmo (OR: 0,9 e OR: 1,0; respectivamente), e o risco de pacientes com pequenas deleções e inserções, além de mutações *missense* foi menor (OR: 0,5 e 0,3; respectivamente) [57]. Sendo assim, o grupo com maior risco de produzir anticorpos anti-FVIII foi o que possuía maiores alterações no gene [32, 43].

GENES DE CITOCINAS

As citocinas são um grupo de glicoproteínas ou proteínas moduladoras que se ligam ao seu respectivo receptor nas células, e são produzidas em resposta a uma variedade de estímulos [62], como, por exemplo, a agentes infecciosos, tumores, estresse, etc [63]. Essa interação resulta na ativação de um segundo mensageiro e vias de transdução de sinal dentro da célula. O processo de secreção de citocinas é altamente regulado, de modo que, a quantidade de citocinas secretada retorna aos níveis basais após a remoção do estímulo. Os níveis de citocinas variam de acordo com determinantes genéticos e ambientais que influenciam cada indivíduo [62].

A variação genética que resulta em alteração na estrutura e expressão das citocinas pode ter consequências patológicas, como por exemplo, conduzir o indivíduo a

doenças crônicas, promover um aumento no risco de infecções, alterar o curso de uma doença aguda ou cirurgia [62]. Além disso, as citocinas podem atuar como fatores de crescimento de linfócitos primários, como moléculas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, e podem desempenhar papel fundamental no deslocamento de linfócitos. Nos últimos 25 anos, as citocinas têm sido de grande importância para a terapia, diagnóstico e prognóstico e de várias doenças humanas [64].

GENE *TNF*

O gene *TNF* (#191160) está localizado na região de classe III do cromossomo 6, entre as regiões de HLA de classe I e II [69]. Vários polimorfismos no gene *TNF* foram descritos, alguns dos quais também tem relação com doenças inflamatórias e mediadas por anticorpos [70]. Os mecanismos pelos quais estes polimorfismos podem influenciar no risco de desenvolver o inibidor incluem uma maior indução dos níveis de transcrição e aumento dos níveis de TNF- α que estimulam a formação de anticorpos [71].

Alguns estudos demonstraram associações de polimorfismos deste gene com a formação de inibidores em pacientes com HA [66, 72]. Polimorfismos na região -308 do gene são os que mais são investigados em estudos de associação. Em 2006, Astermark e colaboradores avaliaram 164 pacientes hemofílicos A, e evidenciaram associação do genótipo -308A/A com a formação de inibidores. O alelo -308A foi identificado em 46 (59,7%) dos 77 pacientes com inibidores e em 40 (46,0%) dos 87 pacientes sem inibidores, porém não houve significância estatística ($P = 0,087$; OR = 1,7). Em contrapartida, houve associação entre o genótipo -308A/A e a formação de inibidores, evidente no subgrupo de pacientes (n=124) com HA grave ($P < 0,001$; OR = 19,2) [66]. Outro estudo que avaliou o mesmo SNP identificou que indivíduos homozigotos para o alelo A apresentam maiores riscos de desenvolver inibidores quando comparados aos heterozigotos (OR: 7,519; 95% CI: 3,168 - 17,844). Essa constatação também foi evidente quando analisados os pacientes hemofílicos A graves (OR: 8,163; 95% CI: 2,521 - 26,434) [72].

Em outro estudo com pacientes da Alemanha, também foi confirmada uma frequência mais alta do polimorfismo -308G>A (0,22 vs .0,13; OR 1,80) no gene *TNF*. O genótipo homozigoto A/A (OR 4,7) esteve mais pronunciado em pacientes hemofílicos graves com inibidores do FVIII [67].

Um estudo desenvolvido na Índia com a participação de 120 hemofílicos A graves verificou que o polimorfismo rs1799724 C/T (-857C/T) heterozigoto, previamente não identificado em outras populações, esteve estatisticamente mais frequente no grupo de pacientes positivos para o inibidor ($P = 0,021$, OR: 3,190, 95% CI: 1,273-7,990) [73].

GENE *IL10*

O gene *IL10* (#124092) está localizado no cromossomo 1 e também possui regiões altamente polimórficas. Possui 5 SNPs e regiões de microssatélites que resultam em vários haplótipos conservados e que definem os fenótipos em alto, intermediário e baixo produtores de IL-10 [74]. O alelo -1082G, por exemplo, é associado à alta produção de IL-10 e o alelo -1082A com baixa produção desta citocina. O haplótipo GCC é relacionado à alta síntese de IL-10, o haplótipo ACC a uma produção intermediária; e o ATA, a uma baixa produção [75]. O alelo 134 é associado a uma alta produção de IL-10, e pacientes com este alelo apresentam um fenótipo alto-produtor visto que mediante estímulo antigênico com o fator deficiente, ocorre uma expansão dos clones de células B específicas e a produção de anticorpos [41].

Uma associação positiva em relação ao alelo *IL10*¹³⁴*G foi observada em um estudo com pacientes hemofílicos da Alemanha. O alelo *IL10*¹³⁴*G foi identificado em 44 (26,8%) de 164 pacientes. Trinta e dois (72,7%), desses 44 pacientes, desenvolveram anticorpos anti-FVIII, comparados com 45 (37,5%) dos 120 pacientes sem o alelo. Dentre os 77 pacientes com história de inibidores na família, 32 (41,6%) também eram positivos para este alelo comparados com 12 (13,8%) dos 87 pacientes sem inibidores na família ($P: 0,001$; OR: 4,4). Uma associação também significativa com a produção

de inibidores foi identificada para o alelo *IL10*^{134*}G, observada no subgrupo de pacientes com hemofilia A grave (*P*: 0,001; OR: 5,4) [67].

Em relação aos polimorfismos em regiões promotoras do gene *IL10*, o haplótipo GCC/ATA foi encontrado na maioria dos pacientes hemofílicos A da Índia e positivos para o inibidor (*P*: 0,011; OR: 3,492; 95% CI: 1,402-8,696). Enquanto que o haplótipo ATA/ATA esteve presente na maioria dos pacientes hemofílicos A negativos para inibidores (*P*: 0,025; OR: 0,278; 95% CI: 0,096-0,802). Ainda neste estudo, a presença do haplótipo GCC esteve significativamente associada aos pacientes que desenvolveram inibidor (*P*: 0,002; OR: 3,452; 95%; CI: 1,607-7,416) [73].

No Brasil, 60 pacientes hemofílicos A foram estudados, sendo que 30 destes desenvolveram inibidores. Em discordância com o estudo anterior, o haplótipo GCC/ATA, correspondente ao perfil de produtor intermediário da citocina IL-10, esteve associado com o grupo de pacientes que não desenvolveram inibidores (*P*: 0,043; OR: 3,55; 95% CI: 1,01-12,57). Já o haplótipo GCC/ACC, também associado à produção intermediária de IL-10, mostrou associação significativa com o grupo de pacientes positivos para o inibidor (*P*: 0,0267; OR: 5,82; 95% CI: 1,11-30,56) [76].

Outro estudo brasileiro demonstrou que os SNPs *IL10* -819 C>T e *IL10* -592 C>A (*P*: 0,024 e *P*: 0,016, respectivamente) estavam associados à susceptibilidade em desenvolver o inibidor. As frequências alélicas de -819 T (0,40 vs. 0,26; *P*: 0,028) e -592 A (0,40 vs. 0,25; *P*: 0,019) estavam aumentadas em pacientes com inibidores comparados aos sem inibidores. Os pacientes que apresentam estes alelos (OR: 3,21; CI: 1,45-7,1 e OR: 3; CI: 1,36-6,49, respectivamente) e o haplótipo TA (OR: 2,61; CI: 1,22-5,59) têm maior risco de desenvolver inibidores [77]. Resultados similares foram encontrados por Lu e colaboradores em pacientes da China [78].

OUTROS SNPs

O antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico ou *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4* (CTLA-4) (#123890) é um receptor de células T ativadas que regulam a atividade dessas células [77]. Uma associação negativa foi encontrada entre o SNP de

CTLA-4 C>T -318 e o desenvolvimento de inibidores (OR: 0,3; 95% IC: 0,1-0,8; *P*: 0,012) em um estudo realizado entre irmãos com HA grave (total de 124 indivíduos, sendo que 63 desenvolveram inibidores). Dez pessoas de um total de 32 que apresentavam o alelo T desenvolveram inibidores, enquanto que 53 pessoas com inibidores não possuíam o alelo. Isso indica que a presença do alelo T na posição -318 pode regular a atividade do CTLA-4 de modo que o sinal co-estimulatório fornecido pela interação CD28-B7 seja interrompido e interfira na ativação da resposta imune contra o FVIII infundido [79].

A IL-1 (#147720) é uma citocina pró-inflamatória que atua na maioria das células imunomodulatórias. A IL-4 (#147780) é essencial para a formação de células Th e produção de Ig [41]. Polimorfismos nos genes *IL1B* (rs1143634) e *IL4* (rs2243250) não mostraram associação ao desenvolvimento de inibidores em vários estudos, inclusive no Brasil [41, 65, 73, 76].

JUSTIFICATIVA

A HA é uma doença hemorrágica resultante da deficiência do FVIII da coagulação. A terapia da HA é dificultada pelo desenvolvimento de inibidores do FVIII em alguns indivíduos. Os inibidores são anticorpos que neutralizam a atividade do FVIII infundido, resultando em alteração nos mecanismos de coagulação e na hemostasia.

A identificação de fatores genéticos envolvidos na produção de inibidores por pacientes hemofílicos poderá auxiliar na instituição de novas estratégias terapêuticas que visam à prevenção do efeito inibitório do FVIII, fazendo com que estes pacientes tenham maior expectativa de vida.

Este estudo poderá contribuir para um maior entendimento dos mecanismos envolvidos na susceptibilidade de algumas pessoas em produzir os aloanticorpos ligantes e neutralizantes do FVIII.

OBJETIVOS

GERAL

Identificar os polimorfismos de regiões regulatórias de genes de citocinas e verificar se estão associados ao risco de desenvolvimento de inibidores do FVIII em indivíduos com HA no Estado do Paraná.

ESPECÍFICOS

- Identificar polimorfismos em genes das citocinas IL-1 α , IL-1 β , IL-1R, IL-1RA, IL-4R α , IL-12, INF- γ , TGF- β 1, TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 de pacientes portadores de HA do Estado do Paraná.
- Estimar as frequências alélicas, genótípicas e haplotípicas para estes genes polimórficos nesta população.
- Avaliar a associação destes polimorfismos de genes de resposta imune com a produção de anticorpos anti-FVIII em pacientes com HA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Caio VM, de Paiva e Silva RB, Magna LA, Ramalho AS. [Community genetics and hemophilia in a Brazilian population]. *Cad Saude Publica*. 2001;17:595-605.
- [2] Mannucci PM, Tuddenham EG. The hemophilias--from royal genes to gene therapy. *N Engl J Med*. 2001;344:1773-9.
- [3] World Federation of Hemophilia. Report on the Annual Global Survey 2010. Montreal, Canada: WFH, 2011.
- [4] Kaufman RJ. Biological regulation of factor VIII activity. *Ann Rev Med*. 1992;43:325-39.
- [5] Bolton-Maggs PH, Pasi KJ. Haemophilias A and B. *Lancet*. 2003; 1801-9.
- [6] Giangrande PLF. The molecular basis of hemophilia. *Molec. Hematol*. 2008:184.
- [7] Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, Llinas A, et al. Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia*. 2012.
- [8] White GC, 2nd, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J. 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*. 2001; 560.
- [9] Bowen DJ. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Mol Pathol*. 2002;55:127-44.

- [10] Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature*. 1984;312:326-30.
- [11] Scheiflinger F, Dorner F. Recent advances in the understanding of the molecular biology of hemophilia A: possible implications towards a more effective therapeutic regime. *Wien Klin Wochenschr*. 1999;111:172-80.
- [12] Kane WH, Davie EW. Blood coagulation factors V and VIII: structural and functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders. *Blood*. 1988;71:539-55.
- [13] Saenko EL, Ananyeva NM, Tuddenham EGD, Kemball-Cook G. Factor VIII—novel insights into form and function. *Brit. Journal of Haematol*. 2002;119:323-31.
- [14] Graw J, Brackmann HH, Oldenburg J, Schneppenheim R, Spannagl M, Schwaab R. Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nat Rev Genet*. 2005; 488-501.
- [15] Castaldo G, D'Argenio V, Nardiello P, Zarrilli F, Sanna V, Rocino A, et al. Haemophilia A: molecular insights. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45:450-61.
- [16] Lacroix-Desmazes S, Navarrete AM, Andre S, Bayry J, Kaveri SV, Dasgupta S. Dynamics of factor VIII interactions determine its immunologic fate in hemophilia A. *Blood*. 2008; 240-9.
- [17] Fay PJ, Haidaris PJ, Smudzin TM. Human factor VIIIa subunit structure. Reconstruction of factor VIIIa from the isolated A1/A3-C1-C2 dimer and A2 subunit. *J Biol Chem*. 1991;266:8957-62.
- [18] Rezende SM, Simmonds RE, Lane DA. Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex. *Blood*. 2004; 1192-201.
- [19] Keeling D, Tait C, Makris M. Guideline on the selection and use of therapeutic products to treat haemophilia and other hereditary bleeding disorders. A United Kingdom Haemophilia Center Doctors' Organisation (UKHCDO) guideline approved by the British Committee for Standards in Haematology. *Haemophilia*. 2008;14:671-84.
- [20] Mauser-Bunschoten EP, Rosendaal FR, Nieuwenhuis HK, Rosendaal G, Briet E, van den Berg HM. Clinical course of factor VIII inhibitors developed after exposure to a pasteurised Dutch concentrate compared to classic inhibitors in hemophilia A. *Thromb Haemost*. 1994;71:703-6.
- [21] Gilles JG, Arnout J, Vermeylen J, Saint-Remy JM. Anti-factor VIII antibodies of hemophiliac patients are frequently directed towards nonfunctional determinants and do not exhibit isotypic restriction. *Blood*. 1993;82:2452-61.
- [22] Fulcher CA, de Graaf Mahoney S, Zimmerman TS. FVIII inhibitor IgG subclass and FVIII polypeptide specificity determined by immunoblotting. *Blood*. 1987;69:1475-80.
- [23] Aalberse RC, van der Gaag R, van Leeuwen J. Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response. *J Immunol*. 1983;130:722-6.
- [24] Wight J, Paisley S. The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. *Haemophilia*. 2003; 418-35.
- [25] Kasper CK, Aledort L, Aronson D, Counts R, Edson JR, van Eys J, et al. Proceedings: A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh*. 1975;34:612.
- [26] Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. *Thromb Haemost*. 1995;73:247-51.

- [27] DiMichele DM. Inhibitors in haemophilia: a primer. *Haemophilia*. 2000;6 Suppl 1:38-40.
- [28] Andre S, Meslier Y, Dimitrov JD, Repesse Y, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S, et al. A cellular viewpoint of anti-FVIII immune response in hemophilia A. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2009;37:105-13.
- [29] van der Poll T, de Jonge E, Levi M. Regulatory role of cytokines in disseminated intravascular coagulation. *Semin Thromb Hemost*. 2001;27:639-51.
- [30] Lechler R, Aichinger G, Lightstone L. The endogenous pathway of MHC class II antigen presentation. *Immunological reviews*. 2006;151:51-79.
- [31] Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:233-58.
- [32] Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia*. 2006; 15-22.
- [33] Ghosh K, Shetty S. Immune response to FVIII in hemophilia A: an overview of risk factors. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2009;37:58-66.
- [34] van Kooten C, Banchereau J. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr Opin Immunol*. 1997;9:330-7.
- [35] Oldenburg J, El-Maarri O. New insight into the molecular basis of hemophilia A. *Int J Hematol*. 2006; 96-102.
- [36] Scandella D, Mattingly M, de Graaf S, Fulcher CA. Localization of epitopes for human factor VIII inhibitor antibodies by immunoblotting and antibody neutralization. *Blood*. 1989;74:1618-26.
- [37] Scandella D, Kessler C, Esmon P, Hurst D, Courter S, Gomperts E, et al. Epitope specificity and functional characterization of factor VIII inhibitors. *Adv Exp Med Biol*. 1995;386:47-63.
- [38] Arai M, Scandella D, Hoyer LW. Molecular basis of factor VIII inhibition by human antibodies. Antibodies that bind to the factor VIII light chain prevent the interaction of factor VIII with phospholipid. *J Clin Invest*. 1989;83:1978-84.
- [39] Lenting PJ, van de Loo JW, Donath MJ, van Mourik JA, Mertens K. The sequence Glu1811-Lys1818 of human blood coagulation factor VIII comprises a binding site for activated factor IX. *J Biol Chem*. 1996;271:1935-40.
- [40] Waters B, Lillicrap D. The molecular mechanisms of immunomodulation and tolerance induction to factor VIII. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009;7:1446-56.
- [41] Astermark J. Why do inhibitors develop? Principles of and factors influencing the risk for inhibitor development in haemophilia. *Haemophilia*. 2006;12 Suppl 3:52-60.
- [42] Lee CA, Lillicrap D, Astermark J. Inhibitor development in hemophiliacs: the roles of genetic versus environmental factors. *Semin Thromb Hemost*. 2006;32 Suppl 2:10-4.
- [43] Astermark J, Oldenburg J, Escobar M, White GC, 2nd, Berntorp E. The Malmo International Brother Study (MIBS). Genetic defects and inhibitor development in siblings with severe hemophilia A. *Haematologica*. 2005;90:924-31.
- [44] Astermark J. Inhibitor development: patient-determined risk factors. *Haemophilia*. 2010; 66-70.
- [45] Gouw SC, van der Bom JG, Marijke van den Berg H. Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood*. 2007;109:4648-54.
- [46] Gouw SC, van den Berg HM, le Cessie S, van der Bom JG. Treatment characteristics and the risk of inhibitor development: a multicenter cohort study among

previously untreated patients with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 2007;5:1383-90.

[47] Goudemand J, Rothschild C, Demiguel V, Vinciguerrat C, Lambert T, Chambost H, et al. Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. *Blood.* 2006;107:46-51.

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

[49] Iorio A, Halimeh S, Holzhauer S, Goldenberg N, Marchesini E, Marcucci M, et al. Rate of inhibitor development in previously untreated hemophilia A patients treated with plasma-derived or recombinant factor VIII concentrates: a systematic review. *J Thromb Haemost.* 2010;8:1256-65.

[50] Chalmers EA, Brown SA, Keeling D, Liesner R, Richards M, Stirling D, et al. Early factor VIII exposure and subsequent inhibitor development in children with severe haemophilia A. *Haemophilia.* 2007;13:149-55.

[51] Franchini M. Plasma-derived versus recombinant Factor VIII concentrates for the treatment of haemophilia A: recombinant is better. *Blood Transfusion.* 2010;8:292.

[52] Gill JC. The role of genetics in inhibitor formation. *Thromb Haemost. Germany*1999. p. 500-4.

[53] Astermark J, Berntorp E, White GC, Kroner BL. The Malmo International Brother Study (MIBS): further support for genetic predisposition to inhibitor development in hemophilia patients. *Haemophilia.* 2001; 267-72.

[54] Howard TE, Yanover C, Mahlangu J, Krause A, Viel KR, Kasper CK, et al. Haemophilia management: time to get personal? *Haemophilia.* 2011;17:721-8.

[55] Oldenburg J, El-Maarri O, Schwaab R. Inhibitor development in correlation to factor VIII genotypes. *Haemophilia.* 2002;8 Suppl 2:23-9.

[56] Firshein SI, Hoyer LW, Lazarchick J, Forget BG, Hobbins JC, Clyne LP, et al. Prenatal diagnosis of classic hemophilia. *New England Journal of Medicine.* 1979;300:937-41.

[57] Gouw SC, van den Berg HM, Oldenburg J, Astermark J, de Groot PG, Margaglione M, et al. F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood.* 2012;119:2922-34.

[58] Gouw SC, Van Der Bom JG, Van Den Berg HM, Zewald RA, Ploos Van Amstel JK, Mauser-Bunschoten EP. Influence of the type of F8 gene mutation on inhibitor development in a single centre cohort of severe haemophilia A patients. *Haemophilia.* 2011;17:275-81.

[59] Zimmermann MA, Oldenburg J, Muller CR, Rost S. Unusual genomic rearrangements in introns 1 and 22 of the F8 gene. *Hamostaseologie.* 2011; S69-73.

[60] Boekhorst J, Lari GR, D'Oiron R, Costa JM, Novakova IR, Ala FA, et al. Factor VIII genotype and inhibitor development in patients with haemophilia A: highest risk in patients with splice site mutations. *Haemophilia.* 2008; 729-35.

[61] Arruda VR, Pieneman WC, Reitsma PH, Deutz-Terlouw PP, Annichino-Bizzacchi JM, Briet E, et al. Eleven novel mutations in the factor VIII gene from Brazilian hemophilia A patients. *Blood.* 1995;86:3015-20.

[62] Smith AJ, Humphries SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009; 43-59.

- [63] Bilate AMB. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. *Temas de reumatologia clínica*. 2007;8:47-51.
- [64] Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol*. 2007;37 Suppl 1:S34-45.
- [65] Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, Lefvert AK, Group MS. 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.
- [66] Astermark J, Oldenburg J, Carlson J, Pavlova A, Kavakli K, Berntorp E, et al. Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood*. 2006;108:3739-45.
- [67] 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-alpha and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A. *J Thromb Haemost*. 2009; 2006-15.
- [68] Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol*. 2002;34:275-305.
- [69] Carroll MC, Katzman P, Alicot EM, Koller BH, Geraghty DE, Orr HT, et al. Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:8535-9.
- [70] Bouma G, Crusius JB, Oudkerk Pool M, Kolkman JJ, von Blomberg BM, Kostense PJ, et al. Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol*. 1996;43:456-63.
- [71] Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:3195-9.
- [72] Zhang LL, Yu ZQ, Zhang W, Cao LJ, Su J, Bai X, et al. [Relationship between factor VIII inhibitor development and polymorphisms of TNFalpha and CTLA-4 gene in Chinese Han patients with hemophilia A]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2011;32:168-72.
- [73] Pinto P, Ghosh K, Shetty S. Immune regulatory gene polymorphisms as predisposing risk factors for the development of factor VIII inhibitors in Indian severe haemophilia A patients. *Haemophilia*. 2012;18:794-7.
- [74] Visentainer JEL, Sell AM, Franceschi DA, Lieber SR, de Souza CA. Importância de polimorfismos de genes reguladores de citocinas em transplantes de células progenitoras hematopoiéticas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;44.
- [75] Scassellati C, Zanardini R, Squitti R, Bocchio-Chiavetto L, Bonvicini C, Binetti G, et al. Promoter haplotypes of interleukin-10 gene and sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. Ireland2004. p. 119-22.
- [76] Chaves D, Belisario A, Castro G, Santoro M, Rodrigues C. Analysis of cytokine genes polymorphism as markers for inhibitor development in haemophilia A. *Int J Immunogenet*. 2010; 79-82.
- [77] Agostini D, Rosset C, Botton MR, Kappel DB, Vieira IA, Gorziza RP, et al. Immune system polymorphisms and factor VIII inhibitor formation in Brazilian haemophilia A severe patients. *Haemophilia*. 2012;18:e416-8.
- [78] Lu Y, Ding Q, Dai J, Wang H, Wang X. Impact of polymorphisms in genes involved in autoimmune disease on inhibitor development in Chinese patients with haemophilia A. *Thromb Haemost*. 2012; 30-6.

[79] Astermark J, Wang X, Oldenburg J, Berntorp E, Lefvert AK, Group MS. Polymorphisms in the CTLA-4 gene and inhibitor development in patients with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 2007; 263-5.

CAPÍTULO II

Artigo: New associations: *IL4RA*, *INFG* and *TGFB1* genes and the inhibitor
development in severe haemophilia A

HAEMOPHILIA

Impact Factor: 3.17

ORIGINAL ARTICLE

New associations: *IL4RA*, *INFG* and *TGFBI* genes and the inhibitor development in
severe haemophilia A

Josiane Bazzo de Alencar¹, Luciana Conci Macedo¹, Morgana Ferreira de Barros²,
Camila Rodrigues¹, Andressa Higa Shinzato³, Cinthia Barbosa Pelissari⁴, Júlio
Machado⁴, Ana Maria Sell⁵, Jeane Eliete Laguila Visentainer⁵

¹Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina - Universidade Estadual de Maringá - Maringá - PR - Brasil. ² Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas - Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Cascavel - PR - Brasil. ³Departamento de Medicina - Universidade Estadual de Maringá - Maringá - PR - Brasil. ⁴ Laboratório de Hematologia, Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR) - Curitiba - PR. ⁵Departamento de Ciências Básicas da Saúde - Universidade Estadual de Maringá - Maringá - PR - Brasil.

Mailing address: Av. Colombo, 5790, Departamento de Ciências Básicas da Saúde - Universidade Estadual de Maringá, bloco T20, Maringá, PR, Brazil - CEP 87020-900; Phone number: (44) 3011-5392
E-mail address: jelvisentainer@gmail.com

Abstract

The development of factor VIII (FVIII) inhibitor is the main complication of replacement therapy in patients with haemophilia A (HA). A ratio of 25% of individuals HA develops antibodies (inhibitors) against the FVIII infused during the treatment, thereby reducing their pro-coagulant activity. The immunomodulatory cytokine genes have been related to the risk of development of alloantibodies in several studies. We investigated the polymorphisms in regulatory regions of cytokine genes (*IL1A*, *IL1B*, *IL1R*, *IL1RA*, *IL4RA*, *IL12*, *INFG*, *TGFBI*, *TNF*, *IL2*, *IL4*, *IL6*, and *IL10*) that could

influence the risk of developing inhibitors in patients HA. We studied 165 patients with HA, where 39 developed inhibitors. The results showed that polymorphisms in *INFG* are related with increased risk of developing inhibitor. In contrast, the polymorphisms in *IL4RA* provide protection to patients, and the genotypes of *TGFBI* genes varied between susceptibility and risk. This work wants to contribute to a genetic profile of the individual HA for the risk of inhibitors development to FVIII.

Keywords: haemophilia A, factor VIII, immune response genes, cytokine, inhibitor, polymorphisms.

INTRODUCTION

Neutralizing antibodies (inhibitors) to FVIII is the major complication that may occurs during the replacement therapy of patients HA [1]. The alloantibodies affect the haemostatic effect of FVIII and can occur in approximately 25% of patients with HA. The risk of inhibitors development is substantially major in severe HA [2].

The development of inhibitor is a T-helper cell dependent event and involves several immune mechanisms, including antigen presentation by antigen presenting cells, B cells differentiation and a cytokine microenvironment [3, 4]. Recently, we reported that the variants *HLA-C*16* and *HLA-DRB1*14* are associated with the risk of inhibitors [5]. Polymorphisms in cytokine genes have contributed to determinate the inhibitor risks in HA patients, mainly *IL10* and *TNF* gene polymorphisms [6-8]. Thus, the objective of this study was to investigate a possible association of polymorphisms in

regulatory regions of cytokine genes and the risk of inhibitor development of FVIII in patients with haemophilia A.

Materials and Methods

Patients

Some patients with HA registered in Hemovidaweb-coagulopathies in the State of Paraná, Brazil, between 2007 and 2009, were selected to participated in this study. A total of 165 patients were studied after approbation by the Ethics in Research Involving Human Subjects of the State University of Maringá, and by Ethics Committee of the Health Department of the State of Paraná.

The inhibitor titles greater than 5 BU/mL were considered high response inhibitors, while the titles that never had greater than 5 BU/mL were characterized inhibitors of low response. The HA was classified as severe when the FVIII level was lower than 1%, moderate level of FVIII was considered between 1% and 5%, and mild between 5% and 40%.

Methodology

Blood samples were collected from HA patients and preserved in tubes containing EDTA in freezer at -20° C and maintained until the time of extraction of

DNA. The DNA was extracted from these samples by salting out method modified [9]. The DNA concentration used was 60 ng/ μ L. The genotyping of cytokine genes was performed by polymerase chain reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP) using the protocol recommended by the manufacturer (Invitrogen kit Cytokines®, USA). The cytokine genes studied were *IL1A*-889C>T (rs1800587); *IL1B* -511C>T (rs16944), +3962C>T (rs1143634); *IL1R* pst11970C>T (rs147810); *IL1RA* mspa11100T>C (rs4251961); *IL4RA* +1902G>A (rs147781); *IL12* -1188A>C (rs161560); *INFG* utr5644A>T (rs147570); *TGFB1* +869T>C (rs1982037), +915G>C (rs1800471); *TNFA* -308G>A (rs1800629), -238G>A (rs361525); *IL2* -330T>G (rs2069762), +166G>T (rs147680); *IL4* -1098T>G, -590C>T (rs2243250), -33C>T; *IL6* -174G>C (rs1800795), nt565G>A (rs1800797); and *IL10* -1082A>G (rs1800896), -819C>T (rs1800871), -592C>A (rs1800872). The amplified product was subjected to agarose gel electrophoresis in 3% with sybr green, at 90V and 13 minutes. The agarose gel was then visualised through UV trans-illuminator and the results was interpreted with worksheet available in the kit.

Statistical analysis

The allele, genotype and haplotype frequencies were calculated by direct counting and compared using the Fisher exact test on a 2x2 contingency table. The p-value (*P*) was considered statistically significant when less than 0.05. The observed risk (OR) and confidence interval (95%) were also calculated (http://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php) when *P*<0.05.

Results

Patients

From a total of 165 patients, 39 (23.6%) developed inhibitor. Of these, 27(69.2%) had the high-responding inhibitor and 12 (30.8%) had the low-responding inhibitor. The patients with inhibitor had a mean of 20 years old (from 2 to 69 years old) and the patients without inhibitors had a mean of 26 years (1 to 70). All the patients with inhibitor present severe form of the disease. In addition, the majority of patients without inhibitor had severe haemophilia (82/126).

In general, the ethnic group of patients analyzed was considered mixed, because it was composed of whites, afro-descendents, and indigenous. There was predominance of whites in population studied, representing approximately 85% of patients with inhibitor and 88% of patients in group without inhibitor. However, the prevalence of inhibitors is higher in the group of afro-descendents and indigenous: among afro-descendents and indigenous, 5/18 (27.8%) and 1/3 (33.3%) respectively, had the inhibitor, compared to 33/144 (22.9%) of whites.

IL4RA, INFG, TGFBI genes: novel associations

Comparison of allele frequencies of cytokine genes between the two groups showed statistically significant differences in the *IL4RA* and *INFG*, positively associated with FVIII inhibitors development. The A allele of *IL4RA* was more frequent in patients without inhibitor compared to patients with inhibitor (79.2% vs. 67.9%, $p=0.047$, OR=0.55, CI=0.31-0.97). We also observed increased frequency of the T

allele of *INFG* in patients with inhibitor ($P=0.003$, $OR=2.20$, $CI=1.31-3.72$). The allelic frequencies in cytokine genes that which were associated with the risk of inhibitor are summarized in Table 1.

When genotype frequencies were compared, there was association with *INFG* and *TGFBI* genotypes (Table 2). The patients who present the T allele in homozygosis in *INFG* gene had an increased risk of inhibitor ($P=0.016$, $OR=3.22$, $CI=1.27-8.18$). The data also showed that 43.59% and 25.40% of patients with and without inhibitors, respectively, were TT homozygous at *TGFBI* +869T>C.

In addition, we evaluated haplotypes and diplotypes that could influence the development of the inhibitor. There were increased frequency of the haplotype *TGFBI* (+869, +915) CG in patients without inhibitor ($P=0.045$, $OR=0.560$, $CI=0.32-0.97$) compared with the patients with inhibitor (Table 3).

Other genes

The other genes analyzed (*IL1A*, *IL1B*, *IL1R*, *IL1RA*, *IL12*, *TNF*, *IL2*, *IL4*, *IL6*, *IL10*) showed no statistically differences between the groups (data not shown). However, a trend for higher frequency of the AA genotype of the *TNF* -308G>A polymorphism in patients with inhibitors ($P=0.086$).

Discussion

The single nucleotide substitutions (SNPs) in the regulatory regions of cytokine genes may affect cytokine transcription and influence the production of cytokine in the people. Thus, any difference in the frequencies of cytokine genes between two

populations may have clinical importance [10]. Therefore, this study compared the frequencies of several polymorphisms in wide range of cytokine genes in order to discover a sharper genetic profile of HA patients about the risk of FVIII inhibitor development.

IL4R is a heterodimer that comprising the IL4R α and γ c chains. The *IL4RA* codifies a common α chain to receptors of IL-4 and IL-13. Thus, the alpha-chain binds in these interleukins and mediates their effects on cells [11, 12]. The polymorphisms in *IL4RA* and *IL4* are well characterized in respiratory diseases such as atopy and asthma [13, 14]. This happens because the binding of IL-4 to its receptor induces the expression of the low-affinity IgE receptor (CD23) on B cells and others cells, important in the induction of Th2 response [15]. Hershey *et al.* evaluated the capacity of *IL4RA* alleles to mediate the induction by IL-4 of the expression of CD23 in peripheral-blood mononuclear cells. They found that the IL-4 induced higher levels of CD23 expression in GA heterozygotes than from AA wild type homozygotes [13]. Furthermore, it is known that cytokines secreted by Th2 cells mediate class-switching to IgG4 subclass, the main antibody secreted by the HA patients [16, 17]. If the polymorphism in the *IL4RA* receptors difficult the interaction with their ligands, the antibody secretion activated by Th2 cells becomes compromised. This could explain partly our findings that the A allele of *IL4RA* gene were increased in patients without inhibitors. However, the relationship between the *IL4RA* SNPs and the development of inhibitors in the HA are not reported in literature. And so far, the unique study that had analyzed these polymorphisms found no association [18].

The +874 A>T is the SNP found in the *INFG* gene that has received attention in disease-association studies [19, 20]. The statistical analysis revealed a significant association of the T allele and T/T genotype at position +874 of *INFG* with the FVIII

inhibitor formation. Both the T allele and the TT genotype were increased in patients with HA inhibitors ($p=0.003$ and $p=0.016$, respectively), and the risk was relatively higher when the T was in homozygosis (OR=2.21 and 3.22, respectively). It was reported that the +874T/A SNP of *INFG* directly affects the level of IFN-gamma (INF- γ) in the body and relates the presence of the A+874 allele and the low production of IFN- γ [21]. The INF- γ is an immunomodulatory cytokine that skews the immune response toward a Th1 phenotype. It is also able to increase the induction of class II MHC expression in cells TCD8+, up-regulation of processing and antigen presentation, up-regulation the co stimulatory molecules of antigen-presenting cells, and directly promoting B cell isotype switching [22, 23]. Our data suggest that T/T genotype and allele T correspond to a predisposition in developing the inhibitor, because this profile provides a high production of pro-inflammatory cytokine IFN- γ by the patients, which stimulating a response against FVIII. The same SNPs of *INFG* was studied by other group and no association SNP/inhibitor was found [24].

Analysis of genetic polymorphisms of *TGFBI* occurred at positions +869 T>C and +915 G>C on codons 10 and 25, respectively. The T allele at codon 10 of *TGFBI* was associated with high production of TGF- β 1, and the C allele associated with low production, as well as the C allele at codon 25, and high production when the allele G is present [20]. We observed an increase in TT genotype frequency at codon 10 of *TGFBI* in patients who developed HA inhibitor. Furthermore, the CG haplotype protected the individual from the risk of inhibitor production. Thus the results suggest that patients who did not develop inhibitors have a protector genotype, which leads to less production of the immunoregulatory cytokine TGF- β 1, and patients who have developed inhibitory presented genotype featuring production of greater levels of TGF- β 1. A recent study evaluated the same polymorphisms in *TGFBI* and no significant

result was obtained [24]. Nevertheless, the same group found relationship between “non-GCC” haplotypes of *IL10* gene (minor synthesis of IL-10, anti-inflammatory cytokine) and the inhibitor formation. In our study, the analysis based on the groups that defined as ‘GCC’ and ‘non-GCC’, but we have not obtain a significant result, even as in another Brazilian study [25].

Regarding the *TNF* gene, we found no significant results, which agree with the findings in the other Brazilian cohorts [18, 25]. However, although no statistical significant, there was an increase in the frequency of -308AA genotype in patients with inhibitors. These high frequencies were also observed in the Malmö International Brother Study (MIBS) and in Germany [6, 26]. The studies indicate that G>A at position -308 of *TNF* is associated with higher TNF- α production [27, 28]. The TNF- α is proinflammatory cytokine with immunomodulatory functions [27], and it could be influencing the formation of inhibitors.

When comparing the allelic frequency of hemophiliac patients with inhibitors and a healthy population of southern Brazil [10], we observed that the frequency of the T allele of *INFG* (+874) was larger in our patients with inhibitor (47.4% vs. 42.4%) and lower in patients without inhibitor (30.7% vs. 42.4%). A decrease in frequency was observed when comparing the haplotype CG of *TGFBI* (+869/+915) of our patients with inhibitor and the healthy population (30.26% vs. 36.20%), and an increase of frequency in our patients without inhibitor and the healthy individuals (43.65% vs. 36.20%). This relationship emphasizes the fact that the polymorphism in regulatory genes of cytokine may influence the development of antibodies against FVIII in the HA, by the fact that the increased frequency of these genotypes cytokines interfere with the susceptibility of patients with HA to development of antibodies against FVIII.

Previous literature indicated that Afro-Americans had a higher risk of developing of inhibitors [29, 30]. Our data also contribute to this finding since we observed higher incidence of inhibitors in afro-descendants.

The discrepancy of other studies with the most of our data could be due to the intense miscegenation in Brazil, which confers genotypic profile different inter-Brazilians and other countries.

Conclusion

In conclusion, HA people with the +874 T allele, genotype +874TT in gene *INFG*; and the +869TT genotype in *TGFβ1* increased the susceptibility to develop the FVIII inhibitor. In contrast, subjects with the +874A allele of the gene *INFG*, the allele +1902A in *IL4RA* and CG haplotype in *TGFβ1* are less likely to develop inhibitor. This study paves way for further research in promising new candidates genes for clinical practice. Moreover, it can contribute to the creation of a genetic profile of HA patients, especially those at high risk of inhibitor. More studies of genetic markers are needed to confirm how the polymorphism of cytokines may influence the development of FVIII inhibitor in patients with HA.

Acknowledgements

We acknowledge the Immunogenetic Laboratory of UEM for support and cooperation. We also want to thanks the Haematology Centre of Maringá, Curitiba, Londrina, and Cascavel in Paraná State, Brazil.

Disclosures

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

References

- [1] Bolton-Maggs PH, Pasi KJ. Haemophilias A and B. *Lancet*. 2003; 1801-9.
- [2] Wight J, Paisley S. The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. *Haemophilia*. 2003; 418-35.
- [3] Andre S, Meslier Y, Dimitrov JD, Repesse Y, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S, et al. A cellular viewpoint of anti-FVIII immune response in hemophilia A. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2009;37:105-13.
- [4] White GC, 2nd, Kempton CL, Grimsley A, Nielsen B, Roberts HR. Cellular immune responses in hemophilia: why do inhibitors develop in some, but not all hemophiliacs? *J Thromb Haemost*. 2005;3:1676-81.
- [5] De Barros MF, Herrero JC, Sell AM, De Melo FC, Braga MA, Pelissari CB, et al. Influence of class I and II HLA alleles on inhibitor development in severe haemophilia A patients from the south of Brazil. *Haemophilia*. 2012;18:e236-40.
- [6] 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-alpha and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A. *J Thromb Haemost*. 2009; 2006-15.
- [7] Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, Lefvert AK, Group MS. 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.
- [8] de Alencar JB, Macedo LC, de Barros MF, Rodrigues C, Cadide RC, Sell AM, et al. Importance of immune response genes in hemophilia A. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2013;35:280-6.
- [9] Cardozo DM, Guelsin GA, Clementino SL, Melo FCd, Braga MA, Souza Cd, et al. DNA extraction from coagulated human blood for application in genotyping techniques for human leukocyte antigen and immunoglobulin-like receptors. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2009;42:651-6.
- [10] Visentainer JE, Sell AM, da Silva GC, Cavichioli AD, Franceschi DS, Lieber SR, et al. TNF, IFNG, IL6, IL10 and TGFB1 gene polymorphisms in South and Southeast Brazil. *Int J Immunogenet*. 2008;35:287-93.
- [11] Deichmann K, Bardutzky J, Forster J, Heinzmann A, Kuehr J. Common polymorphisms in the coding part of the IL4-receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;231:696-7.
- [12] Aman MJ, Tayebi N, Obiri NI, Puri RK, Modi WS, Leonard WJ. cDNA cloning and characterization of the human interleukin 13 receptor alpha chain. *J Biol Chem*. 1996;271:29265-70.
- [13] Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *N Engl J Med*. 1997;337:1720-5.
- [14] Zhu N, Gong Y, Chen XD, Zhang J, Long F, He J, et al. Association between the polymorphisms of interleukin-4, the interleukin-4 receptor gene and asthma. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126:2943-51.

- [15] Defrance T, Aubry JP, Rousset F, Vanbervliet B, Bonnefoy JY, Arai N, et al. Human recombinant interleukin 4 induces Fc epsilon receptors (CD23) on normal human B lymphocytes. *J Exp Med*. 1987;165:1459-67.
- [16] Fulcher CA, de Graaf Mahoney S, Zimmerman TS. FVIII inhibitor IgG subclass and FVIII polypeptide specificity determined by immunoblotting. *Blood*. 1987;69:1475-80.
- [17] Reding MT, Lei S, Lei H, Green D, Gill J, Conti-Fine BM. Distribution of Th1- and Th2-induced anti-factor VIII IgG subclasses in congenital and acquired hemophilia patients. *Thromb Haemost*. 2002;88:568-75.
- [18] Agostini D, Rosset C, Botton MR, Kappel DB, Vieira IA, Gorziza RP, et al. Immune system polymorphisms and factor VIII inhibitor formation in Brazilian haemophilia A severe patients. *Haemophilia*. 2012;18:e416-8.
- [19] Smith AJ, Humphries SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009; 43-59.
- [20] Perrey C, Pravica V, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotyping for polymorphisms in interferon-gamma, interleukin-10, transforming growth factor-beta 1 and tumour necrosis factor-alpha genes: a technical report. *Transpl Immunol*. 1998;6:193-7.
- [21] Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol*. 2000;61:863-6.
- [22] Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:749-95.
- [23] Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004;75:163-89.
- [24] Pergantou H, Varela I, Moraloglou O, Economou M, Spanou K, Kapsimali Z, et al. Impact of HLA alleles and cytokine polymorphisms on inhibitors development in children with severe haemophilia A. *Haemophilia*. 2013;19:706-10.
- [25] Chaves D, Belisario A, Castro G, Santoro M, Rodrigues C. Analysis of cytokine genes polymorphism as markers for inhibitor development in haemophilia A. *Int J Immunogenet*. 2010; 79-82.
- [26] Astermark J, Oldenburg J, Carlson J, Pavlova A, Kavakli K, Berntorp E, et al. Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood*. 2006;108:3739-45.
- [27] Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:3195-9.
- [28] Hajeer AH, Hutchinson IV. Influence of TNFalpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease. *Hum Immunol*. 2001;62:1191-9.
- [29] Gill JC. The role of genetics in inhibitor formation. *Thromb Haemost*. Germany 1999. p. 500-4.
- [30] Astermark J, Berntorp E, White GC, Kroner BL. The Malmo International Brother Study (MIBS): further support for genetic predisposition to inhibitor development in hemophilia patients. *Haemophilia*. 2001; 267-72.

Table 1. Alleles of cytokines genes associated with the risk of development of inhibitor.

Cytokine Gene	Allele	Inhibitor positive N(%)	Inhibitor negative N(%)	P-value	OR	IC
		N=78	N=250			
<i>IL4RA</i> (+1902)	G	25 (32.05%)	52 (20.80%)	0.047	1.79	0.31-0.97
	A	53 (67.94%)	198 (79.20%)		0.55	1.02-3.16
		N=78	N=248			
<i>INFG</i> (+874)	A	41 (52.56%)	176 (70.96%)	0.003	0.45	0.26-0.76
	T	37 (47.43%)	72 (30.74%)		2.20	1.31-3.72

N = total number of alleles.

Table 2. Association of genotypes of cytokines genes and the risk of inhibitor development.

Cytokine Gene	Genotype	Inhibitor positive n (%)	Inhibitor negative n (%)	P-value	OR	IC
		n=39	n=124			
<i>INFG</i> (+874)	A/A	12 (30.77%)	64 (51.61%)	0.838		
	A/T	17 (43.59%)	48 (38.71%)	0.708		
	T/T	10 (25.64%)	12 (9.68%)	0.016	3.22	1.27-8.18
		n=39	n=126			
<i>TGFBI</i> (+869)	T/T	17 (43.59%)	32 (25.40%)	0.043	2.26	1.07-4.80
	T/C	14 (35.90%)	67 (53.17%)	0.057		
	C/C	8 (20.51%)	27 (21.42%)	0.671		

n = number of patients.

Table 3. *TGFBI*/haplotype and the risk of FVIII inhibitor.

Cytokine gene	Haplotype Diplotype	Inhibitor positive N(%), n(%)	Inhibitor negative N(%), n(%)	P-value	OR	IC
		N=76	N=252			
<i>TGFBI</i> (+869/+915)	TG	46 (60.53%)	131 (51.98%)	0.237		
	CG	23 (30.26%)	110 (43.65%)	0.045	0.560	0.32-0.97
	CC	5 (6.58%)	11 (4.36%)	0.147		
	TC	2 (2.63%)	0	1.000		

N = total number of alleles; n = total number of patients.

Artigo: Importance of immune response genes in hemophilia A.

REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA

ImpactFactor: 0.1562

ISSN: 1516-8484

Edição nº4, volume 35, páginas 280-286, 2013

DOI: 10.5581/1516-8484.20130095

Artigo de Revisão

Código de fluxo: 2243 (Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia)

IMPORTÂNCIA DE GENES DE RESPOSTA IMUNE NA HEMOFILIA A.

IMPORTANCE OF IMMUNE RESPONSE GENES IN HEMOPHILIA A.

Autores

Josiane Bazzo de Alencar - josibazzo15@hotmail.com: Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina - Universidade Estadual de Maringá - Maringá - PR - Brasil.

Luciana Conci Macedo - luconci@gmail.com: Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina - Universidade Estadual de Maringá - Maringá - PR - Brasil.

Morgana Ferreira de Barros - morganabarros@hotmail.com: Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas - Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Cascavel - PR - Brasil.

Camila Rodrigues - kmila_rodrigues_2@hotmail.com: Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina - Universidade Estadual de Maringá - Maringá - PR - Brasil.

Renata Campos Cadide - renata.cadide@hotmail.com: Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina - Universidade Estadual de Maringá - Maringá - PR - Brasil.

Ana Maria Sell - amsell@uem.br: Departamento de Ciências Básicas da Saúde - Universidade Estadual de Maringá - Maringá - PR - Brasil.

Jeane Eliete Lagula Visentainer - jelvisentainer@gmail.com: - () - Departamento de Ciências Básicas da Saúde - Universidade Estadual de Maringá - Maringá - PR - Brasil.

Descritores (Palavras-chave)

Hemofilia A; Coagulação Sanguínea; Fator VIII; Complexo Principal de Histocompatibilidade; Citocinas

Keywords

Hemophilia A; Blood Coagulation; Factor VIII; Major Histocompatibility Complex; Cytokines

Resumo (Português)

Hemofilia A é uma doença causada pela deficiência de Fator VIII (FVIII) de coagulação, resultante de herança genética ligada ao cromossomo X. Um dos tratamentos é a administração do FVIII de coagulação, plasmático ou recombinante. No entanto, alguns pacientes desenvolvem anticorpos contra este fator, os quais são denominados de

Abstract. (English)

Hemophilia A is a disease caused by a deficiency of coagulation factor VIII (FVIII) resulting from genetic inheritance linked to chromosome X. One treatment option is the administration of plasma or recombinant FVIII. However, some patients develop inhibitors or antibodies against this factor. Inhibitors are alloantibodies that

inibidores. Inibidores são aloanticorpos, que se ligam no epítipo do FVIII e são reconhecidos pelo sistema imune como peptídeos estranhos. Essa é a mais séria complicação que um paciente hemofílico pode desenvolver durante a terapia de reposição. Alguns estudos têm sugerido que fatores genéticos influenciam no desenvolvimento dos inibidores do FVIII, como etnia, histórico familiar, mutações no gene do FVIII e em genes do sistema imunológico. O objetivo deste estudo foi realizar um levantamento bibliográfico para avaliar a influência de fatores genéticos e genes da resposta imune, em especial os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade e de citocinas, que possam estar relacionados ao desenvolvimento de inibidores do FVIII em pacientes hemofílicos A. O entendimento desses fatores de risco ajudará no futuro a determinar um tratamento diferenciado para o controle e prevenção do desenvolvimento de inibidores.

bind to the epitope of FVIII causing it to be recognized by the immune system as a foreign peptide. This is the most serious complication of hemophilia patients in respect to replacement therapy. Some studies have suggested that genetic factors influence the development of FVIII inhibitors such as ethnicity, family history, mutations in the FVIII gene and in genes of the immune system. The aim of this study was to conduct a literature review to assess the influence of genetic factors of immune response genes, especially genes of the major histocompatibility complex and cytokines, which may be related to the development of FVIII inhibitors in hemophilia A patients. Understanding these risk factors will help to determine future differential treatment in the control and prevention of the development of inhibitors.

Trabalho submetido em 16/4/2013 21:30:50

Instituição: Universidade Estadual de Maringá - Departamento de Ciências Básicas da Saúde - Laboratório de Imunogenética

Correspondência: Av. Colombo, 5790, Maringá, PR, Brazil - CEP 87020-900; Phone number: (44) 3011-5392

E-mail address: jelvisentainer@gmail.com

Introduction

Hemophilia A is a bleeding hereditary disorder caused by the deficiency or abnormality of FVIII coagulant activity.¹ The deficiency or dysfunction of FVIII, glycoprotein that operate as cofactor in the activation of factor X via activated factor IX, does not allow the formation of a normal clot at the site of an injury.¹⁻³ In 2010, according to the register of the World Federation of Hemophilia, there were approximately 10,065 hemophilia patients in Brazil with 80% being hemophilia A.⁴

The treatment of hemophilia A involves FVIII replacement therapy. However, some patients develop inhibitors, that are polyclonal antibodies against the administered FVIII.⁵ This reduces the effectiveness of replacement therapy and causes one of the main complications in the treatment of these patients.^{5,6} Various mechanisms are involved in the inhibitors formation, for example, the ethnicity, family history, FVIII gene (*F8*)-related mutations and processes that involve immune system genes. The study of genetic factors is essential to elucidate mechanisms that may influence the development of inhibitors as in the absence of a genetic predisposing factor there is much lower risk of developing inhibitors. On the other hand, the combined action of genetic and non-genetic factors can significantly contribute to the development of inhibitors. These factors may activate or inhibit the immune response depending on changes in immunological regulators and cytokine profiles. By predicting these factors in patients, it may be possible to avoid the formation of FVIII inhibitors and provide more effective treatment.⁷

As the identification of factors involved in the mechanisms involved in the development of inhibitors in hemophilia A is of paramount importance, the aim of this study was to conduct a review of the literature in order to assess the influence of genetic factors and immune system genes on the development of FVIII inhibitors in hemophilia A patients. This study may contribute to a greater understanding of the mechanisms involved in the susceptibility that some people have in producing alloantibodies against FVIII, as well as to develop new, more effective therapies in hemophilia patients with inhibitors.

Development of FVIII inhibitors

The antibodies, also called inhibitors, are high-affinity immunoglobulins G (IgG) that are directed against to infused FVIII, and this causes decreasing of its effectiveness.⁸ These inhibitors make it more difficult the adequate correction of the bleeding diathesis in case of bleeding and surgery, and also make impossible the regular prophylaxis with FVIII.⁹ The studies have shown that the overall prevalence of

inhibitors in unselected haemophiliac populations is 5–7% and the prevalence amongst severe haemophiliacs is substantially greater, at between 12% and 13%.¹⁰

The FVIII inhibitors are classified as either high- or low-responding. It will depend on how a person's immune system is stimulated upon repeated exposure to FVIII. If the immune system reacts briskly and strongly, the amount of inhibitor directed against FVIII can rise quickly to very high levels, meaning a titer of at least 5 Bethesda units. This type of inhibitor is generally characterized as high-responding. Differently, the immune system may be stimulated in a way such that its response to factor exposure is slower and weaker, and the inhibitor titer will remain low, usually under 5 Bethesda units. When these characteristics are presents, the inhibitor is generally termed as low-responding.¹¹

It is noteworthy that during the lifetime of a person with hemophilia, the risk of development of inhibitor is variable.¹¹ There are reports that the risk is highest soon after first exposure to FVIII, with the cumulative risk of inhibitor development levelling off after 20 exposure days or at 6–10 years of age.¹⁰

The treatment of hemophilia patients with inhibitors is a major challenge, and is based on the use of agents that generate thrombin, independent of the action of FVIII or FIX, the so-called bypassing agents. The two most widely used bypassing agents are activated prothrombin complex concentrate (APCC) and recombinant activated factor VII (rFVIIa). Despite their efficacy in the control of most bleeding episodes, treatment with these agents present several limitations compared to the use of FVIII in non-inhibitor patients such as a less predictable hemostatic response, lack of laboratory monitoring tests, and a higher cost. Furthermore, because of the lower efficacy and shorter half-life, regular prophylaxis is not feasible with these agents.¹¹

Mechanism of the Formation of FVIII inhibitors

Several studies indicate that the immune response triggered by the presence of exogenous FVIII is a T helper cell-mediated event that depends on antigen-presenting cells (APCs), such as macrophages, dendritic cells and B cells.^{12,13}

For the synthesis of antibodies against FVIII to occur, part of the FVIII administered to the hemophilia patient must be internalized by CAAs, degraded and presented to a class II MHC (Major Histocompatibility Complex) molecule.^{12,14} A plasma membrane complex of CAAs, formed when FVIII peptides bind to MHC molecules, is then made available for recognition by CD⁴⁺ T cells.¹⁵ In addition to this, intracellular peptide fragments of FVIII, synthesized in small quantities by the patient, are presented via MHC Class I molecules to CD8⁺ T cells.¹⁶

The peptide-MHC complex on the surface of CAAs is recognized by antigen T cell receptors (TCRs). For the presentation of antigens to the TCRs to be efficient, a second signal occurs between the CAAs and T cells; the co-stimulating CD80/86 molecules expressed in CAAs bind to CD28 expressed in T cells.^{10,17} Activation of T cells occurs when both signals are present; this can be either type-1 helper T cell (Th1) activation, responsible for the secretion of cytokines such as interferon-gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-2 (IL-2), which are important in the cellular immunity system, or type-2 helper T cell (Th2) activation which secretes interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5), Interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10), among others that are important in humoral immunity. Moreover, the expression of CD2, CD30, CD40L and CD28 is increased on the CD4⁺ T cell surface.^{12,15,18,19} When secreted by Th1 or Th2, these cytokines stimulate the differentiation of B cells, which change the isotype of immunoglobulin and produce specific antibodies against plasma FVIII. In addition, the B cells secrete the cytokine interleukin-12 (IL-12) that in turn stimulates the Th1-mediated production of IFN- γ .¹⁸ The cytokines from Th1 stimulate the development of immunoglobulin G1 (IgG1) and immunoglobulin G2 (IgG2) subclasses, whereas Th2 cells stimulate the development of immunoglobulin G4 (IgG4). Studies in patients with hemophilia A have shown that the titers of high-response inhibitors are correlated to IgG4 levels, which suggests that the Th2-mediated immune response is strongly related to the synthesis of anti-FVIII antibodies.¹⁹

Factors predisposing patients to the development of FVIII inhibitors

Ethnicity and family history of FVIII inhibitors

Ethnicity and family history have been associated with predisposition for the development of FVIII inhibitors. One study showed that Afro-Americans had a higher risk of developing inhibitors.²⁰ This association and family history of the development of inhibitors were also observed in The Malmö International Brother Study (MIBS). The results of this study show that the incidence of inhibitors is high in the subgroup of people of African descent when compared to Caucasians (55.6% vs. vs.27.4%).²¹ It is believed that the racial component is mainly based on genetic variants in immune response determinants, because the FVIII mutation spectrum does not differ between races.¹⁸

Additionally, it was observed that the risk for the formation of inhibitors increases significantly in patients with a family history of inhibitors; the absolute risk for the development of inhibitors in patients with a history family of inhibitor development was 48% (95% confidence interval – 95% CI = 35-62%), while the risk in patient with no family history was 15% (95% CI = 11-21%).²¹

Another study by the same group assessed the possibility of genetic mutations influencing the formation of inhibitors in individuals of the same family. One hundred and thirteen mainly Caucasian families with two or more brothers with severe hemophilia were analyzed. All brothers in 59 of the families developed inhibitors and 25 (42.4%) of these had a family history of inhibitor development. It was also found that the most common type of mutation in the FVIII gene was inversion of intron 22. Inhibitors were identified in 45 of 74 families (60.8%) with this type of mutation; and in 18 (40%) of these 45 families, all the brothers developed inhibitors.¹⁸

In light of these data, the influence of genetic factors in the development of inhibitors is evident.²¹ Non-genetic factors also appear to influence the immune response and consequently change the risk of developing inhibitors in each family. However, it is unlikely that these factors alone can explain the similarities reported. These observations suggest that there must be changes in the immune response that may be based on both genetic markers and non-genetic factors.¹⁸

Mutations in the FVIII gene

The FVIII gene is located on the end of the long arm of chromosome X (Xq28). It comprises 186,000 base pairs distributed between 26 exons and 25 introns. The product of this gene is a polypeptide of 2332 amino acids (inactivated circulating procofactor) and the activated polypeptide is formed of six arranged domains.^{2,22,23} The A2, A3 and C2 domains are the regions in which anti-FVIII antibodies can react and impair the coagulation cascade.^{24,25} Studies have shown that in patients with missense mutations clustered in the A2 and C2 domains, the risk of inhibitor formation is fourfold greater than in patients with mutations outside this region. This indicates that any changes in the three-dimensional structure of this part of the FVIII molecule may affect its immunogenicity.¹⁸ The anti-A2 antibodies and in some cases of anti-C2, for example, can interact with the A2 domain and C2 domain, respectively, and neutralize the procoagulant activity of FVIII.²⁵ The C2 domain however is affected by anti-C2 antibodies which prevent FVIII binding to phospholipids and von Willebrand factor,²⁶ and anti-A3 antibodies target the A3 domain to prevent the interaction of factor IX with activated FVIII.²⁷

By the year 2012, 5243 types of mutations associated with disease had been reported according to the HAMSTeRS (Haemophilia A Mutation Test and Resource Search Site) electronic database (<http://hadb.org.uk/>).²⁸ The group with the highest risk of producing anti-FVIII antibodies is the one with the greatest changes in the gene.^{18,29} One meta-analysis study observed that the risk of inhibitor development in patients with large deletions and nonsense mutations are higher than in patients with intron 22 inversions (pooled OR = 3.6 and OR = 1.4, respectively). The risk of patients with intron 1 inversions and splice-site mutations is virtually equal (pooled OR = 0.9 and OR = 1.0, respectively), and the risk of patients with small deletions and insertions and missense mutations are lower (pooled OR = 0.5 and 0.3, respectively).⁹ Inversions in intron 22 (30-50%) and intron 1 (0-5%) are usually associated with the severe hemophilia A phenotype and an intermediary risk for forming inhibitors.^{15,30,31}

In Brazil, a study of 86 Caucasian patients, investigated the occurrence of inversion mutations in 47 patients. Of these, 33 (70%) had severe hemophilia and 14 (30%) moderate or mild hemophilia. An increase in the frequency of inversion mutations (13/33; 39.4%) was observed in the subgroup classified as severe with the majority (11/13; 86.4%) being mutations in intron 22.³²

Class I and II HLA molecules

In humans, MHC genes, located on the short arm of chromosome 6, are named human leukocyte antigen (HLA) genes. The HLA system occupies a highly polymorphic DNA region of approximately 3,600 kilobases (Kb). These loci contain most of the genetic information necessary for the development of antigen presentation activity.³³

There are two main types of HLA gene products, class I and class II molecules, which recognize different types of protein antigens, intracellular (cytosolic antigens) and extracellular. CD4 T cells recognize antigens presented by class II molecules, while CD8 cells recognize antigens that are together with class I molecules.^{34,35}

The class III region is found between the groups of class I and II genes, where genes that code for various components of the complement system and structurally related cytokines such as TNF- α , lymphotoxin- α and lymphotoxin- β are located.³⁶

The generation of antibodies against peptide antigens bound to FVIII involves cell cooperation that results in the presentation of antigens to T and B cells. The start of this process involves the processing of proteins by antigen-presenting cells and subsequent association of these peptides to HLA molecules in these cells. For extracellular proteins, such as the exogenous FVIII administered to hemophilia A patients, it is the HLA class II molecules that mediate the processing of antigenic peptides.¹⁴

Recently, the DNA systematic sequence analyses between haplotypes have yielded information on polymorphisms across the complete MHC. This information provides pools of sequence variants for disease association analysis.³⁷ Therefore, several studies are committed to identifying an association between haplotypes of HLA class I and II molecules to the risk for the inhibitors development. Hay et al. studied 176 hemophilia patients in England and found a higher frequency of the HLA-*DRB1*15:01/DQB1*06:02/DQA1*01:02* haplotype in patients with inhibitors, but only the frequency of the *HLA-DQA1*01:02* allele was considered statically significant (OR = 2.7; 95% CI = 1.2-5.9). The *HLA-DRB1*01*, *HLA-DQB1*05:01* and *DRB1*01:01* alleles were also higher in the group of patients with inhibitors in the presence of the

intron 22 inversion mutation, but the values were not statistically significant.³⁸ The *HLA-DQA1*01:02*, *HLA-DQB1*06:02* and *HLA-DRB1*15* alleles were found at higher frequencies in patients with inhibitors by Oldenburg et al. in Germany. Moreover, other HLA class I alleles (*HLA-A*03*, *HLA-B*07* and *HLA-C*07*) were identified at higher frequencies.³⁹

Despite the weak haplotype association in these studies, another more recent investigation demonstrated a significant association for class II HLA molecules. This case-control study found a positive association of the *DRB1*15:01/DQB1*06:02* haplotype with the formation of inhibitors in 260 severe hemophilia patients from Germany ($P = 0.0423$; OR = 1.9; 95% CI = 1.01-3.57).⁴⁰

The studies that had the most statistically significant results were those that tested for associations of alleles of HLA genes in respect to susceptibility or resistance of patients in developing inhibitors. The main associations have been found for HLA class II molecules, perhaps because, from the point of view of immunity, these alleles are more important in presenting the peptides of FVIII to T cells, and so studies have focused more on genotyping these alleles. One study of 57 hemophilia patients (with and without inhibitors) and 36 blood donors without the disease from Thailand found a higher frequency of the *DRB1*15* allele in patients with inhibitors (30.6%) than in patients without inhibitors (19.2%). However, statistical significance was obtained only when the frequency of this allele was compared between patients with inhibitors and controls (30.6% vs. 13.9%; $P = 0.021$; OR = 0.021; 95% CI = 1.16-6.47).⁴¹

In another study performed in Germany, the frequencies of the *HLA-DRB1*16* (0.122 vs. 0.014; $P = 0.0001$) and *DQB1*05:02* alleles (0.112 vs. 0.058; $P = 0.0149$) were higher in the 57 patients with acquired hemophilia enrolled in the study compared to the normal European population. On the other hand, the *HLA-DRB1*15* (0.087 vs. 0.172; $P = 0.026$) and *DQB1*06:02* alleles (0.078 vs. 0.142; $P = 0.0149$) were less frequent in the patients with acquired hemophilia. However, on comparing patients with acquired hemophilia but without inhibitors with those with inhibitors, the *DRB1*16* and *DQB1*05:02* alleles were correlated to lower risk (OR = 1.1 and 1.5, respectively) and the *DRB1*15* and *DQB1*06:02* alleles were considered high risk (OR = 2.2 and 3.7, respectively).⁴²

Recently, an investigation conducted in southern Brazil evaluated the influence of HLA class I and class II alleles on the development of severe hemophilia in a group of 171 patients (50 patients with inhibitors and 131 without inhibitors). This study showed a high frequency of *HLA-C*16* and *HLA-DRB1*14* alleles in patients with inhibitors compared to those without inhibitors, indicating a probable association between these alleles and the development of inhibitors. However, the difference in the frequency of the *HLA-C*16* allele was not statistically significant compared to the healthy population in the region. The *HLA-DRB1*14* allele is more common in white Brazilians than in the Caucasians in general; this may be due to the great miscegenation of the population.⁴³

Most studies have investigated alleles in respect to susceptibility to develop inhibitors. However, resistance alleles are also of great importance in association studies. For example, the *DQA1*01:03*, *DQB1*06:03* and *HLA-C*02* alleles have been reported as having a role in resistance to the development of inhibitors in hemophilia patients.^{38,39}

*HLA-C*05* is another allele that may provide protection against the formation of inhibitors. This was observed in an American population of 44 hemophilia patients, 28 of whom had no inhibitors and 16 were positive. *HLA-C*05* was identified in 11 (39.29%) patients without inhibitors, whereas none in the group with inhibitors had this allele. Therefore, the presence of the *HLA-C*05* acted as a protective factor in the development of inhibitors ($P < 0.02$).⁴⁴

Furthermore, Ohta et al. demonstrated a protective role of the *HLA-A*24* allele. The HLA-A, B and C antigens and HLA-DQA1, DQB1, DRB1 and DPB1 alleles were analyzed in 20 Japanese hemophilia A patients with inhibitors. The results showed that the absence of the *HLA-A*24* allele is a risk factor for the formation of inhibitors compared to its presence (36.8% vs. 82.6%; $P = 0.003$; OR = 0.123). Additionally, according to this study, the *HLA-DRB1*04*, *DQB1*04* and *DQA*03:01* alleles may be associated with the development of inhibitors.⁴⁵

Although some studies have shown that the HLA system, in particular HLA class II molecules, may be of greater importance in the development of inhibitors, the

association between HLA and the formation of FVIII inhibitors is different between different ethnic groups and depends on the geographic region. These data may be useful in the recognition of groups at high risk for the formation of inhibitors in different populations. Table 1 shows some association studies of HLA class I and class II alleles for risks or protection to the development of inhibitors in haemophilia patients.

Polymorphisms in cytokine genes

Cytokines are a group of soluble proteins produced by different cells in response to antigens, which act regulating the innate and adaptive immune reactions. About 180 genes encode these proteins.⁴⁶

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the regulatory regions of cytokine genes, common in many populations, can affect the transcription and influence the production of cytokines and consequently, change the profile of the immune response.⁴⁷ Thus, any difference in the gene frequency of these cytokines in different populations may have clinical relevance and be important to obtain more specific genetic markers for diagnosis and prognosis.^{47,48}

The SNPs in cytokine genes are known due to their association in several diseases^{49,50} as well as their influence on the production of antibodies in autoimmune diseases.⁵¹ Most of the SNPs studied are in promoter regions and in the exon itself, or in microsatellites of intron regions.⁴⁸

Several studies have reported associations of these SNPs with the development of inhibitors in hemophilia A patients (Table 2). A positive association, for example, was observed for the *IL10*¹³⁴*G allele identified in 44 (26.8%) of 164 Germans. Thirty-two (72.7%) of these 44 patients developed anti-FVIII antibodies compared with 45 (37.5%) of 120 patients without the allele. Among 77 patients with family histories of inhibitors, 32 (41.6%) were positive for this allele compared with 12 (13.8%) of 87 patients without family histories of inhibitors ($P = 0.001$; OR = 4.4). A significant association was also observed for the *IL10*¹³⁴*G allele in the subgroup of patients with severe hemophilia A ($P = 0.001$; OR = 5.4).⁴⁰

In a recent study of Chinese hemophilia patients, the -819T and -592A alleles of the *IL10* gene were more frequently found in individuals with FVIII inhibitors. In addition, some haplotypes of this gene (TA at -819 position, and CA and CC at position -592) indicate predisposition of hemophilia patients for developing inhibitors.⁵²

Another cytokine, which also plays an important role in immune modulation in hemophilia patients, is TNF- α . This cytokine has a potent pro-inflammatory action. The analysis of polymorphisms in 4 alleles of the *TNF* gene (-827C>T, -308G>A, -238A>G and 670A>G) of 164 hemophilia patients (124 severe, 26 moderate and 14 mild) identified an association between the -308A/A genotype and the formation of inhibitors. The -308A allele was identified in 46 (59.7%) of 77 patients with inhibitors and in 40 (46.0%) of 87 patients without inhibitors ($P = 0.87$; OR = 1.7). The association between the -308A/A genotype and the formation of inhibitors was also evident in the subgroup of patients (n = 124) with severe hemophilia ($P < 0.001$; OR = 19.2).⁵³

These findings were also observed in other patient groups. The polymorphism in the -308 region of the *TNF* gene was correlated with the development of inhibitors. Individuals homozygous for the allele A present a higher risk of developing inhibitors compared to heterozygotes (OR = 7.519; 95% CI = 3.168-17.844). This relation is also valid on analyzing severe hemophilia patients (OR = 8.163; 95% CI = 2.521-26.434).⁵⁴

Pavlova et al. also confirmed higher frequencies of the -308G>A polymorphism in the *TNF* gene of patients in Germany (0.22 vs. 0.13; OR = 1.80). The homozygous A/A genotype (OR = 4.7) was more pronounced in severe hemophilia patients with FVIII inhibitors. The same group of researchers found that the 1082G allele of the *IL10* gene was more common in these patients (0.55 vs. 0.43; $P = 0.008$).⁴⁰

These and other association studies using genetic targets have focused on finding new markers to try to offer better treatment options to patients and avoid complications. Polymorphisms that influence the Th1/Th2 response may be instrumental to genotypically classify patients and check the risk of developing inhibitors.⁵⁵ Hence, it is evident that polymorphisms in the *TNF* and *IL10* genes are best characterized in respect to the development of inhibitors in hemophilia patients, and may be future candidates.

Final considerations

During the last few years, it has occurred a progress in the identification of determinants for development of anti-FVIII alloantibodies. After analysis of several studies, we observed several factors related to the appearance of hemophilia A, highlighting the immune response genes.

This review highlights several important points: the inhibitors incidence is greater in people with African descendance and in patients with a historic family of the inhibitor development. Furthermore, the risks of inhibitor development in patients with large deletions and nonsense mutations are higher than in patients with intron 22 inversions; and these mutations are related to higher risk of inhibitor development than in patients with mutations with intron 1 inversions and splice-site mutations. In addition, the risk of patients with small deletions and insertions and missense mutations is lower.

The majority of associations of immune response genes to the production of inhibitors in hemophilia patients were related to HLA class II alleles: HLA-DRB1*14, DRB1*15, HLA-DQB1*06:02, DQB1*06:03, HLA-DQA1*01:02, and DQA1*01:03; and the DRB1*15:01/DQB1*06:02 haplotype. Associations have also been found for some HLA class I alleles: HLA-A*03, A*24, HLA-B*07, HLA-C*02, C*05, C*07, and C*16.

In relation to cytokine genes, the alleles *IL10* +134G, -819T, -592A are related to increased risk to production of inhibitors in hemophiliacs. *TNF* is another cytokine gene associated with the formation of inhibitors, specifically the genotype -308A/A.

This review intends to assist in the development of more targeted genetic association studies of hemophilia patients and immune system genes, and also to assist in the understanding of the participation of these genes in the formation of the inhibitors.

Acknowledgements

The authors thank all the employees who participated in the review of the study. The manuscript was linguistically revised by Tania Mara de Oliveira.

References

1. Bolton-Maggs PH, Pasi KJ. Haemophilias A and B. *Lancet*. 2003; 361:1801-1809.
2. Shen BW, Spiegel PC, Chang CH, Huh JW, Lee JS, Kim J, et al. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. *Blood*. 2008; 111:1240-1247.
3. Giangrande PLF. The molecular basis of hemophilia. *Molecular Hematology*. 2008:184p
4. World Federation of Hemophilia. Report on the Annual Global Survey 2010. Montreal, Canada: WFH, 2011.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Manual de reabilitação na hemofilia. Brasília, 2011.
6. Brown TM, Lee WC, Joshi AV, Pashos CL. Health-related quality of life and productivity impact in haemophilia patients with inhibitors. *Haemophilia*. 2009;15(4):911-917.
7. Astermark J. Prevention and prediction of inhibitor risk. *Haemophilia*. 2012; 18(Suppl 4):38-42.
8. Fulcher CA, de Graaf Mahoney S, Zimmerman TS. FVIII inhibitor IgG subclass and FVIII polypeptide specificity determined by immunoblotting. *Blood*. 1987;69(5):1475-1480.
9. Gouw SC, Van den Berg HM, Oldenburg J, Astermark J, Groot PG, Margaglione M, et al. F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood*. 2012; 119(12):2922-2934.
10. Wight J, Paisley S. The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. *Haemophilia*. 2003; 9:418-435.
11. DiMichele DM. Inhibitors in haemophilia: a primer. *Haemophilia*. 2000; 6(Suppl 1):38-40.
12. Andre S, Meslier Y, Dimitrov JD, Repessé Y, Kaveri SV, Lacroix- Desmazes S, et al. A cellular viewpoint of anti-FVIII immune response in hemophilia A. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2009; 37(2):105-113.
13. Astermark J. Inhibitor development: patient-determined risk factors. *Haemophilia*. 2010; 16:66-70.
14. White GC, 2nd, Kempton CL, Grimsley A, Nielsen B, Roberts HR. Cellular immune responses in hemophilia: why do inhibitors develop in some, but not all hemophiliacs? *J Thromb Haemost*. 2005; 3(8):1676-1681.
15. Ghosh K, Shetty S. Immune response to FVIII in hemophilia A: an overview of risk factors. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2009;37(2):58-66.
16. Chaves DG, Rodrigues CV. Development of factor VIII inhibitors in hemophilia A. *Rev. bras. hematol. hemoter*. 2009;31(5):384-390.
17. Hoyer LW. The incidence of factor VIII inhibitors in patients with severe hemophilia A. *Adv Exp Med Biol*. 1995; 386:35-45.
18. Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia*. 2006; 12(Suppl 6):15-22.

19. Pratt KP, Thompson AR. B-cell and T-cell epitopes in anti-factor VIII immune responses. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2009;37(2):80-95.
20. Gill JC. The role of genetics in inhibitor formation. *Thromb Haemost*. 1999; 82:500-504.
21. Astermark J, Berntorp E, White GC, Kroner BL. The Malmo International Brother Study (MIBS): further support for genetic predisposition to inhibitor development in hemophilia patients. *Haemophilia*. 2001; 7:267-272.
22. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion EY, Chen DH, Eaton GA, et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature*.1984; 312(5992):326-330.
23. Castaldo G, D'Argenio V, Nardiello P, Zarrilli F, Sanna V, Rocino A, et al. Haemophilia A: molecular insights. *Clin Chem Lab Med*.2007;45(4):450-461.
24. Scandella D, Mattingly M, de Graaf S, Fulcher CA. Localization of epitopes for human factor VIII inhibitor antibodies by immunoblotting and antibody neutralization. *Blood*. 1989;74(5):1618-1626.
25. Scandella D, Kessler C, Esmon P, Hurst D, Suzanne C, Gomperts E, et al. Epitope specificity and functional characterization of factor VIII inhibitors. *Adv Exp Med Biol*. 1995;386:47-63.
26. Arai M, Scandella D, Hoyer LW. Molecular basis of factor VIII inhibition by human antibodies. Antibodies that bind to the factor VIII light chain prevent the interaction of factor VIII with phospholipid. *J Clin Invest*. 1989; 83(6):1978-1984.
27. Lenting PJ, van de Loo JW, Donath MJ, van Mourik JA, Mertens K. The sequence Glu1811-Lys1818 of human blood coagulation factor VIII comprises a binding site for activated factor IX. *J Biol Chem*. 1996; 271(4):1935-1940.
28. HAMSTeR. Haemophilia A mutation search test and resource site [Accessed 2013]. Available at: <http://hadb.org.uk/>.
29. Astermark J, Oldenburg J, Escobar M, White GC, 2nd, Berntorp E. The Malmo International Brother Study (MIBS). Genetic defects and inhibitor development in siblings with severe hemophilia A. *Haematologica*. 2005;90(7):924-931.
30. Albanez S, Ruiz-Saez A, Boadas A, de Bosch N, Porco A. Identification of factor VIII gene mutations in patients with severe haemophilia A in Venezuela: identification of seven novel mutations. *Haemophilia*. 2011;17(5):e913-918.
31. Zimmermann MA, Oldenburg J, Muller CR, Rost S. Unusual genomic rearrangements in introns 1 and 22 of the F8 gene. *Hamostaseologie*. 2011; 31(Suppl 1):S69-73.
32. Soares RP, Chamone DA, Bydlowski SP. Factor VIII gene inversions and polymorphisms in Brazilian patients with haemophilia A: carrier detection and prenatal diagnosis. *Haemophilia*. 2001; 7:299-305.
33. Howell WM, Carter V, Clark B. The HLA system: immunobiology, HLA typing, antibody screening and crossmatching techniques. *J Clin Pathol*. 2010; 63:387-390.
34. Magalhães PSC, Böhlke M, Neubarth F. The Major Histocompatibility Complex (MHC): genetic codification, structural bases and clinical implications. *Rev. Med. UCPEL(Pelotas)*.2004;2(5):59p.
35. Donadi EA. How to understand the nomenclature and the mechanisms involved on the association between histocompatibility antigens and alleles with disease. *Medicina (Ribeirão Preto)*.2000;33(1):7-18.

36. Meyer D, Thomson G. How selection shapes variation of the human major histocompatibility complex: a review. *Ann Hum Genet.* 2001; 65:1-26.
37. Traherne JA. Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies. *Int J Immunogenet.* 2008; 35:179-192.
38. Hay CR, Ollier W, Pepper L, Cumming A, Keeney S, Goodeve AC, et al. HLA class II profile: a weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe haemophilia A. UKHCDO Inhibitor Working Party. *Thromb Haemost.* 1997;77(2):234-237.
39. Oldenburg J, Picard JK, Schwaab R, Brackmann HH, Tuddenham EG, Simpson E. HLA genotype of patients with severe haemophilia A due to intron 22 inversion with and without inhibitors of factor VIII. *Thromb Haemost.* 1997;77(2):238-242.
40. 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-alpha and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 2009; 7:2006-2015.
41. Nathalang O, Sriwanitchrak P, Sasanakul W, Chuansumrit A. The association between HLA class II alleles and the occurrence of factor VIII inhibitor in Thai patients with hemophilia A. *Turk J Hematol.* 2012; 29:34-39.
42. Pavlova A, Zeitler H, Scharrer I, Brackmann HH, Oldenburg J. HLA genotype in patients with acquired haemophilia A. *Haemophilia.* 2010; 16:107-112.
43. De Barros MF, Herrero JC, Sell AM, De Melo FC, Braga MA, Pelissari CB, et al. Influence of class I and II HLA alleles on inhibitor development in severe haemophilia A patients from the south of Brazil. *Haemophilia.* 2012;18(3):e236-240.
44. Aly AM, Aledort LM, Lee TD, Hoyer LW. Histocompatibility antigen patterns in haemophilic patients with factor VIII antibodies. *Br J Haematol.* 1990;76(2):238-241.
45. Ohta H, Takahashi I, Kojima T, Takamatsu J, Shima M, Yoshioka A, et al. Histocompatibility antigens and alleles in Japanese haemophilia A patients with or without factor VIII antibodies. *Tissue Antigens.* 1999;54(1):91-97.
46. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology.* 7^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier;2011.8p.
47. Visentainer JE, Sell AM, da Silva GC, Cavichioli AD, Franceschi DS, Lieber SR, et al. TNF, IFNG, IL6, IL10 and TGFB1 gene polymorphisms in South and Southeast Brazil. *Int J Immunogenet.* 2008;35(4-5):287-293.
48. Franceschi DAS, Viel DO, Sell AM, Tsuneto LT, Visentainer JEL. Otimização de metodologia PCR-SSP para identificação de polimorfismos genéticos de TNF e IL2. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2009; 31(4):241-246.
49. Hollegaard MV, Bidwell JL. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 3. *Genes Immun.* 2006; 7:269-276.
50. Scheller J, Ohnesorge N, Rose-John S. Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer. *Scand J Immunol.* 2006; 63:321-329.
51. Visentainer JEL, Sell AM, Franceschi DA, Lieber SR, de Souza CA. Importância de polimorfismos de genes reguladores de citocinas em transplantes de células progenitoras hematopoiéticas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.*2008;44(4).

52. Lu Y, Ding Q, Dai J, Wang H, Wang X. Impact of polymorphisms in genes involved in autoimmune disease on inhibitor development in Chinese patients with haemophilia A. *Thromb Haemost.* 2012; 107:30-36.
53. Astermark J, Oldenburg J, Carlson J, Pavlova A, Kavakli K, Berntorp E, et al. Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood.* 2006;108(12):3739-3745.
54. Zhang LL, Yu ZQ, Zhang W, Cao LJ, Bai X, Ruan CG. Relationship between factor VIII inhibitor development and polymorphisms of TNFalpha and CTLA-4 gene in Chinese Han patients with hemophilia A. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2011;32(3):168-172.
55. Lozier JN, Rosenberg PS, Goedert JJ, Menashe I. A case-control study reveals immunoregulatory gene haplotypes that influence inhibitor risk in severe haemophilia A. *Haemophilia.* 2011;17(4):641-649.
56. Chaves D, Belisario A, Castro G, Santoro M, Rodrigues C. Analysis of cytokine genes polymorphism as markers for inhibitor development in haemophilia A. *Int J Immunogenet.* 2010; 37:79-82.
57. Pinto P, Ghosh K, Shetty S. Immune regulatory gene polymorphisms as predisposing risk factors for the development of factor VIII inhibitors in Indian severe haemophilia A patients. *Haemophilia.* 2012; 18(5):794-7.

Table 1. Analysis of HLA alleles class I and II associated to the development of the inhibitor in several studies.

Alleles	Risk of the Development of Inhibitor	References
HLA Class I		
<i>C*05</i>	Decreased	Aly <i>et al.</i> , 1990 ⁴⁴
<i>A*24</i>	Decreased	Otha <i>et al.</i> , 1999 ⁴⁵
HLA Class II		
<i>DR4.1(DRB1*04:01)</i>	Increased	Otha <i>et al.</i> , 1999 ⁴⁵
<i>DQB1*04</i>	Increased	Otha <i>et al.</i> , 1999 ⁴⁵
<i>DQA1*03:01</i>	Increased	Otha <i>et al.</i> , 1999 ⁴⁵
<i>DQB1*05:02</i>	Decreased	Pavlova <i>et al.</i> , 2010 ⁴²
<i>DRB1*16</i>	Decreased	Pavlova <i>et al.</i> , 2010 ⁴²
<i>DQB1*06:02</i>	Increased	Pavlova <i>et al.</i> , 2010 ⁴²
<i>DQA1*01:02</i>	Increased	Hay <i>et al.</i> , 1997 ³⁸
<i>DRB1*15</i>	Increased	Pavlova <i>et al.</i> , 2010 ⁴²
<i>DRB1*15</i>	Increased	Nathalang <i>et al.</i> , 2012 ⁴¹

Table 2. Analysis of SNPs in cytokine genes associated with the development of inhibitors in HA.

Cytokine gene	Genotype	Allele	Haplotype	Risk of the development of inhibitor	Reference
<i>IL10</i> ⁻¹⁰⁸²	<i>IL10</i> ⁻¹⁰⁸² G/G	<i>IL10</i> ⁻¹⁰⁸² *G	<i>IL10</i> ^{-1082,-819,-592} GCC	Increased	Pavlova <i>et al.</i> , 2009 ⁴⁰
<i>IL10</i> ^{-1082,-819,-592}	-	-	<i>IL10</i> ^{-1082,-819,-592} GCC/ATA	Decreased	Chaves <i>et al.</i> , 2010 ⁵⁶
<i>IL10</i> ^{-1082,-819,-592}	-	-	<i>IL10</i> ^{-1082,-819,-592} GCC/ACC	Increased	Chaves <i>et al.</i> , 2010 ⁵⁶
<i>IL10</i> ⁻⁸¹⁹	<i>IL10</i> ⁻⁸¹⁹ C/T	<i>IL10</i> ⁻⁸¹⁹ *T	<i>IL10</i> ^{-819,-592} TA, <i>IL10</i> ^{-819,-592} CA, <i>IL10</i> ^{-819,-592} CC	Decreased	Lu <i>et al.</i> , 2012 ⁵²
<i>IL10</i> *	-	-	<i>IL10</i> ^{-1082,-819,-592} ATA/ATA	Decreased	Pinto <i>et al.</i> , 2012 ⁵⁷
<i>TNF</i> ⁻³⁰⁸	<i>TNF</i> ⁻³⁰⁸ A/A	-	haplotype 2	Increased	Astermark <i>et al.</i> , 2006 ⁵³
<i>TNF</i> ⁻³⁰⁸	<i>TNF</i> ⁻³⁰⁸ A/A	-	-	Increased	Zhang <i>et al.</i> , 2011 ⁵⁴
<i>TNF</i> ⁻⁸⁵⁷	-	-	rs1799724C/T** GCC/ATA	Increased	Pinto <i>et al.</i> , 2012 ⁵⁷

**IL10* promoter 'CA' dinucleotide microsatellite.

**rs1799724C/T is the same that *TNF*⁻⁸⁵⁷ C/T.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

Os pacientes com HA do Estado do Paraná apresentam um perfil genotípico diferente dos analisados em outras regiões do Brasil e do mundo. A maioria dos estudos de associação relaciona o desenvolvimento de inibidores aos polimorfismos dos genes *IL10* e *TNF*. Nosso estudo envolveu uma ampla gama de polimorfismos em genes de citocinas e concluímos que há aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento de inibidor em pacientes com o alelo +874T e genótipo +874TT no gene *INFG*; e para o genótipo +869TT no *TGFBI*. E, em pacientes com o alelo +874A no gene *INFG*; alelo +1902A no *IL4RA*; e haplótipo CG no *TGFBI*, há um menor risco de desenvolvimento de inibidores do FVIII.

Este estudo buscou auxiliar a identificação de genes promissores ao tratamento dos indivíduos com HA que desenvolvem inibidores, além de contribuir para traçar um perfil genético dos pacientes HA gravemente afetados. Porém, estudos mais detalhados de como estes marcadores genéticos poderiam influenciar o desenvolvimento de inibidores ainda são necessários.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar os tipos de mutação (inversões, grandes deleções, pequenas deleções/inserções, entre outros) no gene do FVIII e sua relação com o desenvolvimento de inibidores, visto que o tipo de defeito no gene pode influenciar na resposta imune contra o FVIII. Sabe-se que pacientes com grandes deleções no gene do FVIII, mutações *nonsense* e mutações intracromossômicas aberrantes têm um potencial de risco maior em desenvolver os inibidores, por isso é importante avaliar estas mutações nos pacientes com HA aqui estudados;

- Analisar se os tipos de mutações encontradas nos pacientes com HA alteram o peptídeo FVIII codificado, a fim de verificar se o paciente está expressando uma proteína FVIII não funcionante;
- Comparar as associações de polimorfismos de citocinas encontradas neste estudo com a produção destas citocinas por citometria de fluxo para avaliar se há influência na regulação imune.