



Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Análises Clínicas
Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia

MORGANA FERREIRA DE BARROS

ESTUDO DE GENES DE RESPOSTA IMUNE EM PACIENTES COM
HEMOFILIA

MARINGÁ
2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS APLICADAS À
FARMÁCIA

MORGANA FERREIRA DE BARROS

Estudo de genes de resposta imune em pacientes com Hemofilia

Maringá
2009

B277e Barros, Morgana Ferreira de

Estudo de genes de resposta imune em pacientes com hemofilia / Morgana Ferreira de Barros. – Maringá: UEM,2010.

54 f.: Il., Color., figs.

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

Co-orientador : Prof^a. Dr^a. Juliana Curi Martinichen Herrero

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia.

1. HLA. 2. Hemofilia. 3. Polimorfismo Genético. 4. Biologia Molecular. 5. PCR-SSO. 6. Imonogenética. 7. Coagulopatias. 8. Inibidores. I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia. II. Título.

CDD 574.87
575.1
616.151

MORGANA FERREIRA DE BARROS

Estudo de genes de resposta imune em pacientes com Hemofilia

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

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

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

Co-Orientador: Prof^ª Dr^ª Juliana Curi Martinichen Herrero

Maringá
2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

MORGANA FERREIRA DE BARROS

Estudo de genes de resposta imune em pacientes com Hemofilia

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

COMISSÃO JULGADORA

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

Prof^ª Dr^ª Lilian Maria Castilho
Universidade Estadual de Campinas

Prof^ª Dr^ª Eliana Valéria Patussi
Universidade Estadual de Maringá

Dra. Ana Maria Sell
Universidade Estadual de Maringá

Dra Tatiana Takahashi Higa
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 18 de dezembro de 2009.

Local de defesa: Sala 109, Bloco I-90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu querido pai, que foi um exemplo como filho de Deus, pois soube por a dimensão humana acima de qualquer obstáculo, dizia sempre que “Para servir aquele que tem menos há sempre condições para buscar mais”. E afinal, um dia iremos para um grande encontro onde as lágrimas secarão ao som da música perene...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por toda a força e proteção durante as viagens, e pela inspiração.

A minha mãe, Sílvia Maria, pelo amor, incentivo, apoio incondicional, companheirismo e suporte emocional, além dos sacrifícios e concessões, pois mesmo sempre nas minhas ausências, tomou conta de nossa empresa, sem nunca perder a força e coragem para continuar. As minhas irmãs, Michele e Kauana, muito obrigada pelo amor, incentivo e pela participação ativa em muitos momentos do meu trabalho.

À família De Marco de Oliveira, pelo grande apoio e por me darem condições de ficar alojada em Maringá. Aos meus queridos amigos, por compreenderem minha ausência, mesmo nos seus momentos especiais. Aos meus alunos por facilitaram nossas trocas de aulas nos momentos em que precisei estar ausente, foram vocês os principais incentivadores para continuação desse estudo.

Aos queridos pacientes hemofílicos, por acreditarem na força das pesquisas, na esperança de que um dia seus problemas serão solucionados, vocês foram os principais responsáveis para que esse trabalho se realizasse; e àqueles falecidos, meus sentimentos e que repousem na glória do Senhor.

Aos funcionários do Laboratório de Imunogenética, Fabiano, Elen, Marcos e Edna, obrigada pela atenção, apoio e paciência dedicada em todos os momentos que estivemos presentes.

A todos os professores e seus convidados pelo carinho, dedicação e entusiasmos demonstrados ao longo do Programa de Graduação/ PBF, passando seus conhecimentos com sabedoria e paciência, especialmente os professores Ana Maria Sell, Ricardo A. Moliterno, Rafael Campos Bezerra e Lilian Castilho. As secretárias do PBF, Luciane e Amélia por estarem sempre prontas a atenderem minhas dúvidas.

Em especial, à minha orientadora, Prof^a. Jeane Visentainer, toda minha gratidão e admiração. Obrigada pelos conhecimentos científicos, dedicação e confiança transmitidos no decorrer desses dois anos. Muito obrigada pelas oportunidades oferecidas a mim, por ter acreditado na minha capacidade e por ter feito parte da concretização de um dos meus sonhos! “Sonho que se sonha só. É só um sonho que se sonha só. Mas sonho que se sonha junto é realidade.”

EPÍGRAFE

“É chato chegar
A um objetivo num instante
Eu quero viver
Nessa metamorfose ambulante
Do que ter aquela velha opinião
Formada sobre tudo”
Raul Seixas

Estudo de genes de resposta imune em pacientes com Hemofilia

RESUMO

A hemofilia é uma doença causada pela deficiência dos fatores de coagulação do sangue. Destes, 80% dos casos ocorrem por deficiência do fator VIII - hemofilia A ou clássica e 20% dos casos, deficiência do fator IX – hemofilia B. O tratamento é baseado na reposição de fatores de coagulação. No entanto, além da infecção com vírus da hepatite e HIV, existe um evento adverso mais sério encontrado no tratamento da hemofilia, a formação dos inibidores do fator VIII e IX (em menor frequência). Inibidores são aloanticorpos, que se ligam no epítipo do Fator VIII que são reconhecidos pelo sistema imune como peptídeos estranhos. Alguns estudos têm sugerido que fatores genéticos e ambientais influenciam no desenvolvimento dos inibidores do FVIII. O objetivo deste estudo foi realizar uma revisão da literatura sobre a influência de fatores genéticos e ambientais que possam estar envolvidos no risco de desenvolvimento de inibidores, tendo como foco principal, identificar os genes de resposta imune (HLA de classe I e II) que possam influenciar na formação do inibidor em pacientes com Hemofilia A do Sul do Brasil. Foram realizadas as genotipagens dos alelos de Classe I e II de amostras de sangue de pacientes com hemofilia A cadastrados no Estado do Paraná. Os resultados foram apresentados no artigo¹, “Influência dos alelos HLA de Classe I e II no desenvolvimento do inibidor em pacientes com Hemofilia A do Sul do Brasil”, e confirmam que o gene HLA está envolvido na produção do inibidor e poderiam ser usados como uma ferramenta para reconhecer grupos de alto risco para um possível desenvolvimento de inibidores entre pacientes hemofílicos do Estado do Paraná, Sul do Brasil. Este estudo contribui ao melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na produção de inibidores por alguns indivíduos e não por outros.

Palavras-chave: Fator VIII; genes do sistema imune; inibidores; predisposição genética.

Study of immune response genes in patients with hemophilia

ABSTRACT

Hemophilia is a disease caused by deficiency of blood coagulation factors. Of these, 80% of cases occur due to deficiency of factor VIII - Hemophilia A or classic and 20% of cases, deficiency of factor IX - hemophilia B. The treatment is based on the replacement of coagulation factors. However, in addition to infection with hepatitis and HIV, there is a more serious adverse event found in the treatment of hemophilia, the formation of inhibitors of Factor VIII and IX (less frequently). Inhibitors are alloantibodies, which bind the epitope of Factor VIII that are recognized by the immune system as foreign peptides. Some studies have suggested that genetic and environmental factors influence the development of FVIII inhibitors. The objective of this study was to review the influence of genetic and environmental factors that may be involved in the risk of inhibitor development, with the main focus, to identify immune response genes (HLA class I and II), which may be influencing the inhibitor formation in patients with hemophilia A in South Brazil. Were performed genotyping of Class I and II alleles an blood samples from patients with hemophilia A registered in the State of Paraná. The results were presented in article 1, "Influence of HLA Class I and II alleles on inhibitor development in hemophilia A patients from the South Brazil", and confirm that the HLA gene is involved in the production of the inhibitor and could be used as a tool to recognize high-risk groups for possible development of in hemophilia patients from the State of Paraná, South of Brazil. This study contributes to better understanding of the mechanisms involved in the production of inhibitors by some individuals and not by others.

Keywords: Factor VIII; immune system genes; inhibitors; genetic predisposition.

Dissertação elaborada e formatada conforme as
normas das publicações científicas:

Haemophilia *The Official Journal of the World
Federation of Hemophilia* (artigo 1)

Disponível em:

<http://www.wiley.com/bw/submit.asp?ref=1351-8216>

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I	12
1.1	Introdução	12
1.2	Hemofilia A	12
1.3	O papel do Fator VIII	13
1.4	O gene do FVIII.....	14
1.5	Classificação e manifestações clínicas	14
1.6	Tratamento	15
1.7	Desenvolvimento de inibidores	16
1.8	Classificação dos inibidores	19
1.9	Diagnóstico	19
1.10	Fatores ambientais	20
1.10.1	<i>Tratamento, Idade da primeira exposição, Tipos de produtos</i>	20
1.11	Fatores genéticos	20
1.11.1	<i>Gravidade da hemofilia</i>	21
1.11.2	Etnia e História de inibidores na família	21
1.11.3	<i>Mutações no gene do Fator VIII</i>	21
1.11.4	<i>Polimorfismos nos genes das citocinas</i>	22
1.11.5	<i>Sistema HLA de Classe I e II</i>	23
1.12	Justificativa.....	27
1.13	Objetivos.....	27
1.14	Referências	28
2	CAPÍTULO II	33
2.1	Influência os alelos HLA de Classe I e II no desenvolvimento do inibidor em pacientes com Hemofilia A do Sul do Brasil	34
3	CAPÍTULO III	53
3.1	Conclusões.....	53
3.2	Perspectivas Futuras	54

CAPÍTULO I

1.1 Introdução

As hemofilias são doenças hemorrágicas resultantes das deficiências de fator VIII (Hemofilia A) ou de fator IX (Hemofilia B) da coagulação, decorrentes de mutações nos genes que codificam estes fatores. A Hemofilia A (75 a 80%) é mais frequente que a Hemofilia B (20 a 25%) e acomete, aproximadamente, 1:10.000 nascimentos masculinos, em diversas populações étnicas e geograficamente distintas estudadas. A gravidade e a frequência de episódios hemorrágicos estão relacionados ao nível residual de atividade de fator VIII presente no plasma, o qual se relaciona ao tipo de mutação associada à doença.

A hemofilia não tem cura e a base de seu tratamento é a infusão do concentrado do fator deficiente. Durante o tratamento, alguns pacientes podem desenvolver anticorpos contra o fator administrado exogenamente, que neutralizam a ação do fator e comprometem o efeito terapêutico hemostático. Essa complicação ocorre mais frequentemente nos pacientes com Hemofilia A cujo assunto será abordado em seguida.

1.2 Hemofilia A

A Hemofilia A (clássica) é uma coagulopatia que ocorre pela deficiência do Fator VIII que é uma glicoproteína participante da via intrínseca da coagulação sanguínea. A hemofilia pode ser de origem adquirida ou congênita (hereditária). A forma adquirida mais rara é associada a doenças auto-imunes, câncer, gravidez e causas idiopáticas. A forma congênita tem como etiologia a herança genética, ligada ao cromossomo X, a qual é transmitida quase que exclusivamente a indivíduos do sexo masculino (Figura 1) por mãe portadora assintomática (maioria dos casos), porém, cerca de 20%-30% dos casos decorrem de mutação adquirida (sem história familiar prévia) [1,2,3].

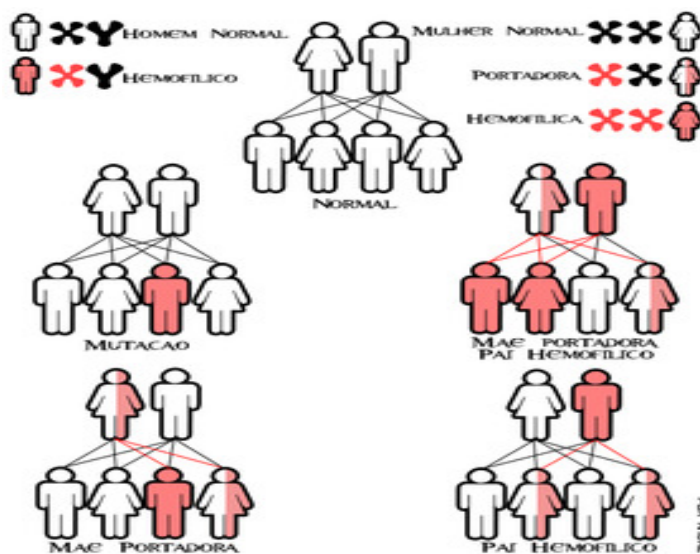


Figura 1. Hereditariedade da hemofilia

Fonte: <http://PT.wikipedia.org/wiki/ficheiro:hemilia.png>

1.3 O papel do Fator VIII

O fator VIII (FVIII) é uma glicoproteína plasmática que atua como um iniciador e regulador da via intrínseca da cascata da coagulação.

Na Hemofilia A, a deficiência ou disfunção do FVIII que atua como co-fator na ativação do Fator X pelo Fator IX ativado, não permite a formação de um coágulo no local de uma lesão. Na maioria, este fator é sintetizado no fígado e circula no sangue associado ao Fator de von Willebrand (FvW) que estabiliza e protege da degradação proteolítica e promove a sua concentração no local da lesão vascular, esquema representado na Figura 2A [4,5,6].

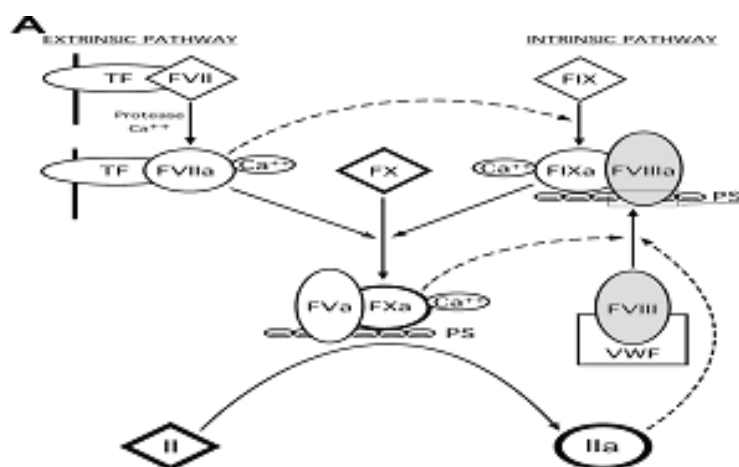


Figura 2. Cascata da coagulação.

Fonte: Adaptado de Shel et al, 2008 [6].

1.4 O gene do FVIII

O gene do FVIII está localizado na extremidade do braço longo do cromossomo X (porção Xq28) e compreende 186.000 pb distribuídos entre 26 éxons e 25 íntrons (Figura 3A). O produto deste gene é um polipeptídeo de 2332 aminoácidos (pró co-fator circulante inativado) precedidos por um peptídeo sinal de 19 resíduos que direciona a passagem do FVIII através da célula (Figura 3B). O polipeptídeo é formado de seis domínios co-arranjados A1-A2-B [cadeia pesada]-A3-C1-C2 [cadeia leve] (Figura 3B e C) [7,8,9].

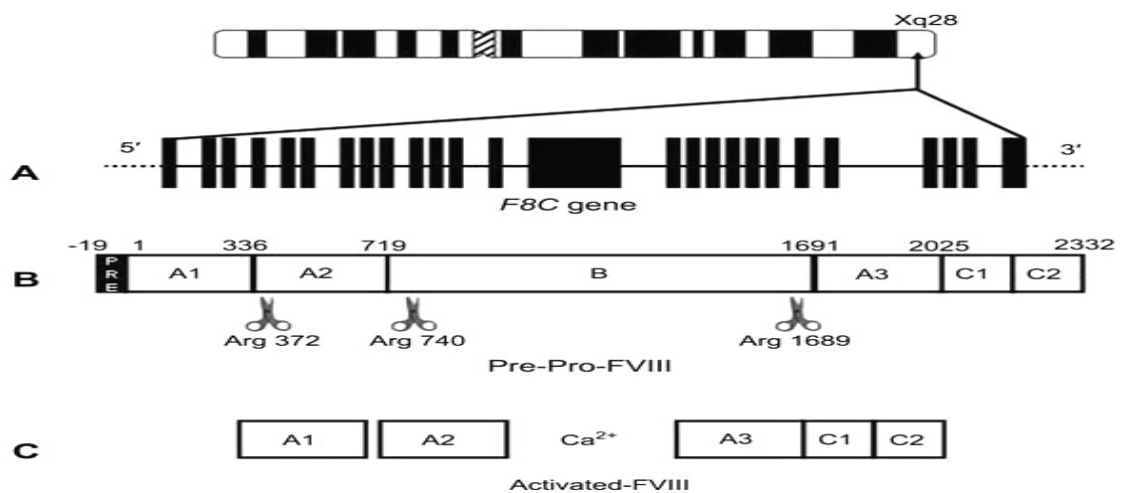


Figura 3. O gene e a estrutura proteica do FVIII.

Fonte: Castaldo et al, 2007 [8].

1.5 Classificação e manifestações clínicas

A classificação da gravidade da hemofilia é baseada na sintomatologia clínica e na concentração plasmática dos fatores de coagulação.

A classificação usada mais recentemente é baseada nos níveis plasmáticos de FVIII, permitindo uma classificação fenotípica em hemofilia grave (nível do FVIII <1%), moderada (nível entre 1% a 5%) e leve (5% a 40%), sendo o nível normal definido como 1U/mL ou 100% e que pode variar de 0,4 U/mL a 1,5 U/mL (40% a 150%) [10].

As manifestações clínicas hemorrágicas são variáveis conforme a gravidade do caso. Assim, em pacientes com as formas grave da doença, maioria dos pacientes (50% dos casos), as primeiras hemorragias acontecem, em geral, no segundo ano de vida. As hemorragias ocorrem em maior frequência sob forma de hematomas e hemartroses (joelho, tornozelo e cotovelo) e muitas vezes são espontâneas. Podem também ocorrer sob forma de hematúria, epistaxe, melena/hematêmese e sangramentos internos para a cavidade torácica e

retroperitoneal, além de hemorragia intracraniana. A presença repetida de sangue na articulação leva ao espessamento e à hipertrofia da sinovial, a alterações de cartilagem articular e a evolução para artropatia hemofílica. A hemofilia moderada (30% dos casos) caracteriza-se por sangramentos após pequenos traumas, com alguns episódios de hemorragias espontâneas e com menos intercorrências. Já na hemofilia leve (20% dos casos), os sangramentos espontâneos nunca ocorrem, têm sido habitualmente associados com acidentes ou traumatismo intenso e o diagnóstico é muitas vezes reconhecido na idade adulta por ocasião de uma cirurgia ou extração dentária. A classificação e manifestações clínicas estão resumidas no Quadro 1 [1,2,3,11].

Concentração de fator (VIII ou IX)	Classificação	Clínica
<0,01 IU/mL (<1% do normal)	Grave	Hemorragias espontâneas nas articulações e músculos; hemorragias após traumas, acidentes e cirurgias
0,01-0,05 IU/mL (1%-5% do normal)	Moderado	Hemorragias nas articulações e músculos após pequenos traumas, hemorragia excessiva após cirurgia e extração dentária
>0,05-0,40 IU/mL (5-40% do normal)	Leve	Não ocorrem sangramentos espontâneos, e sim após cirurgias, extrações dentárias e acidentes

Quadro 1. Classificação da hemofilia e manifestações clínicas.

1.6 Tratamento

O tratamento da hemofilia evoluiu muito e, basicamente, consiste na reposição do fator anti-hemofílico de acordo com o quadro clínico. Infelizmente, devido ao tempo de meia-vida curto do FVIII (8 a 12 horas), é impossível manter um nível constante do FVIII nos hemofílicos por administração contínua [2,11].

O fator VIII, retirado do plasma de pessoas com níveis de concentração normais, começou a ser usado por volta de 1965, quando se desenvolveu o crioprecipitado (concentrado precipitado a frio do Fator VIII). No entanto, por esse concentrado de fator FVIII ser produzido a partir de plasma humano, os pacientes apresentavam grande riscos de contaminação pelo vírus da hepatite e HIV. Hoje, seu uso está proibido de acordo com a RDC n°23, publicada em 25 de janeiro de 2002 [11,12,13].

Na década de 1980, métodos de inativação do vírus, reduziram o número desses eventos. Porém, foi na década de 1990, quando foram implantados protocolos de *screening* da bolsa de sangue dos doadores para anticorpos contra HCV, e também a entrada de novas técnicas de inativação e a liofilização do concentrado de fator VIII (pdFVIII), que os riscos de contaminação foram drasticamente reduzidos [11-15].

Atualmente, a clonagem do gene do fator VIII permitiu a produção de FVIII humano usando técnicas de DNA recombinante (rFVIII), o qual atua tão efetivamente quanto o pdFVIII, porém ainda tem um alto custo (estimado em até U\$100.000/ano/paciente) [11,16].

Alguns pacientes, numa incidência em torno de 18% e 28% e prevalência entre 5% e 18%, sendo a maioria dos pacientes com Hemofilia A grave, desenvolvem inibidores (aloanticorpos), os quais neutralizam a ação do FVIII administrado exogenamente, impedindo seu efeito hemostático [17,18].

Além das complicações como artropatias, problemas venosos, hepatites virais e HIV, a formação do inibidor é atualmente o mais sério evento adverso encontrado na terapia de reposição. Quando isto ocorre, resulta na diminuição significativa da qualidade e expectativa de vida dos pacientes, além do tratamento tornar-se mais caro [4].

Atualmente, no Brasil, o tratamento para pacientes hemofílicos com diagnóstico de inibidor é feito com o uso do concentrado de complexo protrombínico ativado (agentes *bypass*), sendo de primeira escolha em casos de pacientes com hemofilia leve a moderada com presença de inibidor; e, também, o uso do fator VII recombinante ativado (rFVIIa), sendo de segunda escolha ou último recurso [19]. Num estudo recente, a média total dos custos médicos diretos (do início ao fim do sangramento) foi estimada ser de US\$13.500 para o concentrado de complexo protrombínico (aPCC) e US\$ 7.590 para o rFVIIa, mostrando que o rFVIIa comparado ao aPCC, foi mais efetivo e com menor custo quando usado como tratamento de primeira escolha para pacientes com hemofilia leve a moderada e com inibidor [20]. Semelhante estudo realizado na Coreia, também obteve os mesmos resultados [21].

1.7 Desenvolvimento de inibidores

Várias linhas de pesquisa indicam que a resposta imune desencadeada pela presença do FVIII exógeno é um evento célula T-helper dependente que envolve células apresentadoras de antígeno (APC) e linfócitos B.

Para que ocorra a síntese dos anticorpos contra o FVIII (anti-FVIII), alguns dos FVIII administrado exogenamente no paciente hemofílico é endocitado pelas células apresentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas ou células B) onde ocorre o processo de degradação proteolítica e a ligação dos peptídeos formados à molécula do MHC de classe II [22,23]. Após a ligação entre os peptídeos do FVIII e as moléculas do MHC, forma-se um complexo na membrana plasmática das APCs, o qual é exposto para o reconhecimento pelas células T CD4+ [24]. Adicionalmente, fragmentos peptídicos de

moléculas de FVIII intracelulares, sintetizadas em pequena quantidade pelo paciente, podem ser apresentados via MHC de classe I aos linfócitos T CD8+ [16].

Porém, o início dessa resposta requer o reconhecimento específico do peptídeo FVIII pelas células T, por meio do receptor antigênico das células T (TCRs), caracterizando assim o primeiro sinal de ativação. Para que ocorra boa apresentação do antígeno ao TCR é necessário um segundo sinal entre a APCs e células T, feito tipicamente através de moléculas co-estimuladoras CD80/86 que são expressas nas APCs e CD28 expresso na célula T [22]. Na presença de ambos os sinais, ocorre a ativação da célula T, que pode ser tanto a ativação da célula Th1, responsável pela secreção de citocinas importantes na imunidade celular como: interferon gama ($\text{IFN-}\gamma$), fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$) e IL-2, assim como a ativação da célula Th2 que secreta as interleucinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 entre outras, importantes na imunidade humoral; e também ocorre aumento da expressão dos CD2, CD30, CD40L e CD28 na superfície da célula TCD4+ [23-26]. Essas citocinas quando secretadas pelas células Th1 ou Th2 estimulam a diferenciação dos linfócitos B, que trocam o isótipo da imunoglobulina de acordo com o estímulo recebido, e que por sua vez produzem os anticorpos (imunoglobulinas) específicos contra o FVIII no plasma (Figura 4), assim como também secretam citocinas (IL-12) que vão estimular a produção do $\text{IFN-}\gamma$ mediadas pelas células Th1 [26]. As citocinas provenientes das células Th1 estimulam o desenvolvimento das subclasses IgG1 e IgG2, enquanto que as de células Th2 estimulam o desenvolvimento das IgG4. Estudos demonstraram que pacientes com hemofilia A e com títulos de inibidores de alta resposta, foram correlacionados com níveis de IgG4, o que indica que a resposta imune por células Th2 estão fortemente relacionadas com a síntese de anticorpos anti-FVIII [25].

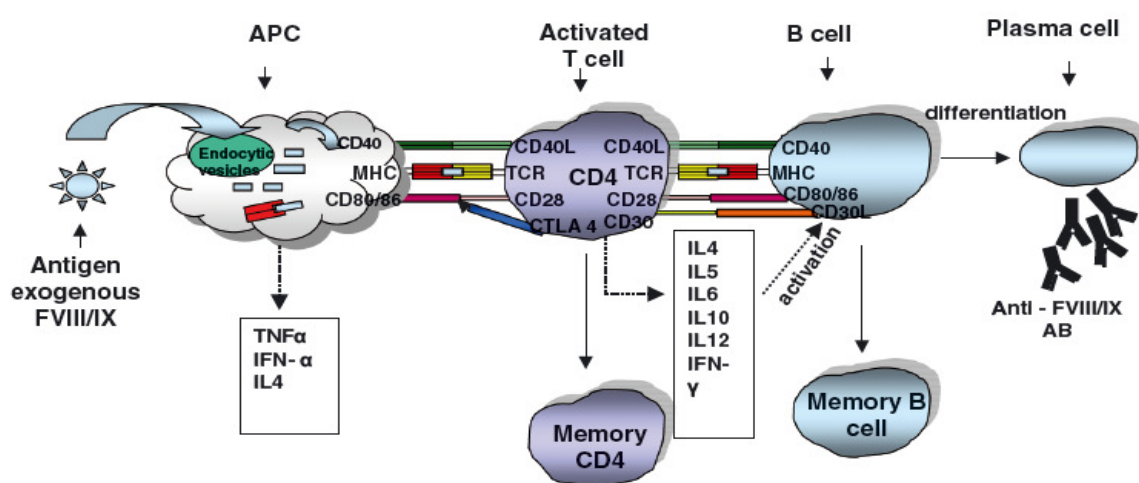


Figura 4. Produção de anticorpos específicos contra o FVIII.

Fonte: Oldenburg J.; Pavlova A., 2006 [26].

Os anticorpos anti-FVIII sintetizados reagem com os epítomos da molécula do FVIII, nos domínios A2, A3 e C2, comprometendo a ligação com fosfolípídeos, fator de von Willebrand, fator IX e fator Xa, dificultando a ativação do fator VIII pela trombina ou não permitirem a posterior liberação do FVIII ligado ao Fator de von Willebrand (Figura 5) [5,19,25, 27].

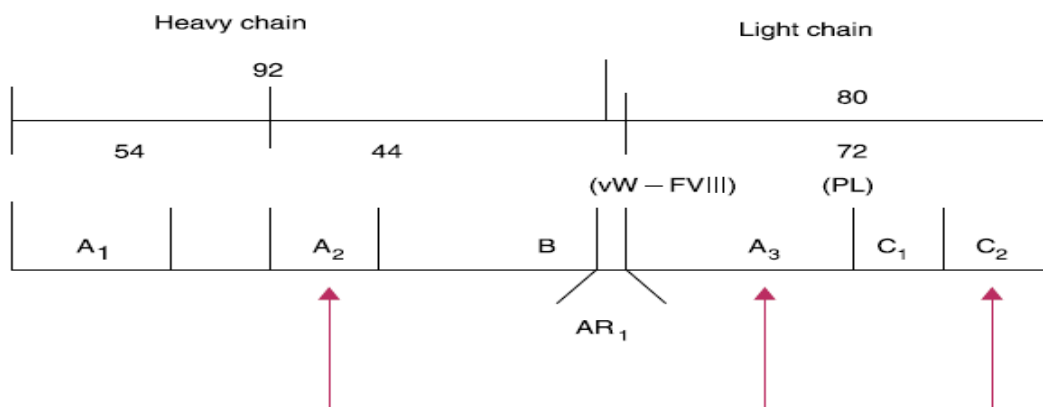


Figura 5. Sítios de ligação para os inibidores da molécula do FVIII.

A molécula do FVIII (~ 300 kDa, 2332 aminoácidos) consiste de 3 domínios A e 2 C homólogos, e um único domínio B, que são dispostos em ordem de A1-A2-B-AR1-A3-C1-C2. O domínio A2 (anticorpos anti-A2 reduzem a atividade catalítica do fator X), C2 (anticorpos anti-C2 impedem a ligação do FVIII aos fosfolípídeos e ao fator de von Willebrand) e A3 (anticorpos anti-A3 impedem a interação do fator IX com o FVIII ativado) são os principais alvos para a ligação do inibidor, como indicado pelas setas. Fonte: Dimichele, 2006 [19].

Um importante receptor, o CTLA4, expresso nas células T $CD4^+$ e $CD8^+$ recentemente ativadas, homólogo estruturalmente ao CD28, também interage com ligantes CD86 e CD80 na APC, resultando na inibição e regulação negativa da ativação das células T. A Figura 6, demonstra um mecanismo proposto de como o CTLA4 inibe a ativação da célula T [28].

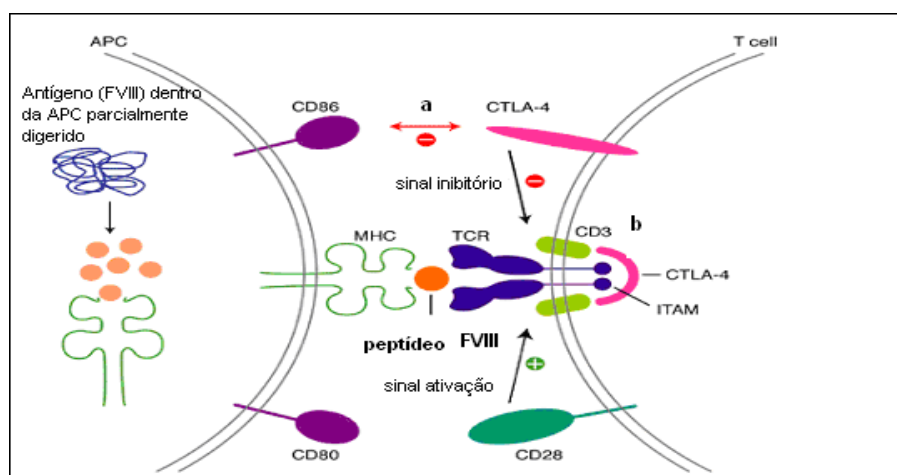


Figura 6. Mecanismos propostos pelos quais CTLA4 inibe a ativação da célula T.

a) CTLA-4 deve competir com CD28 pelos ligantes CD80/86 e, assim, inibir o efeito co-estimulatório de CD28. b) CTLA-4 deve diretamente interagir com o complexo TCR-CD3 na sinapse imunológica, para romper a ativação da célula T, por ligar e bloquear o imunorreceptor da tirosina - baseado na ativação do ITAM. Adaptada de Brand et al. (2005) [27].

Um possível tratamento para impedir a formação do inibidor, seria promover o bloqueio da estimulação conjunta, evitando o desencadeamento das respostas imunes mediadas pelas células T. Com base nisso, foi realizado um estudo em animais, onde a administração de anticorpo monoclonal CTA4-Ig inibia o primeiro sinal de ativação das células T. Este estudo sugeriu que estratégias ligadas a B7-CD28 são potenciais terapias para impedir a formação dos anticorpos ao VIII [29].

1.8 Classificação dos inibidores

Os inibidores podem ser classificados segundo o título de anticorpos circulantes e a resposta antigênica. Deve-se considerar de baixa resposta os inibidores que mantêm níveis persistentemente $\leq 5\text{UB/ml}$, apesar de constante estímulo com infusão do concentrado de fator deficiente. O termo inibidor de alta resposta deve ser utilizado para aqueles casos em que a atividade inibitória seja $> 5\text{UB/ml}$, em qualquer momento da existência do inibidor. Isto decorre do fato dos níveis de inibidores poderem baixar na ausência de estimulação antigênica, isto é, na ausência da exposição ao fator deficiente. Entretanto, uma vez ocorrendo nova exposição, o paciente pode responder elevando o título novamente (reação anamnésica). Embora a escolha de 5UB/ml como ponto de corte seja arbitrária, a experiência clínica sugere que pacientes com inibidores $> 5\text{UB/ml}$ são completamente refratários a infusão do fator deficiente (fator VIII ou IX) [17].

Não se tem conhecimento sobre a relevância clínica dos inibidores transitórios, recomendando-se, por isso, o acompanhamento desses pacientes. A adoção de condutas diferenciadas no tratamento de hemorragias nos pacientes com inibidores é determinada por esta classificação [2,19].

1.9 Diagnóstico

A presença destes anticorpos pode ser descoberta durante a análise clínica rotineira ou, alternativamente, quando um quadro hemorrágico não é paralisado tão rapidamente como poderia se esperar em resposta ao tratamento com o fator.

A detecção do inibidor pode ser realizada pela rotina laboratorial pelo menos a cada 3-12 meses, e mais rigorosos monitoramentos para crianças durante os seus 50-200 primeiros dias de exposição ao fator. Podem ser detectados por três técnicas: teste de mistura e pesquisa do inibidor que são testes de triagem, e quantificação do inibidor. Uma vez detectado a presença do inibidor pelos testes de rastreamento, é preciso realizar a quantificação. O método de Bethesda e o método de Nijmegen (Bethesda modificado) são os recomendados pela Federação Mundial de Hemofilia, os quais testam a capacidade do plasma do paciente em inativar o plasma com concentração de FVIII normal. A titulação de anticorpos dosada por estes testes é descrita como o número de unidade Bethesda (UB); 1 unidade (UB) é definida como a quantidade de anticorpo que neutraliza 50% do FVIII presente no plasma ativado (*pool* normal) de referência. Diluições seriadas do plasma do paciente deverão ser efetuadas a fim de quantificar títulos superiores a 1,5-2,0 UB/mL, sendo que títulos de 0,5 UB ou maior sugerem a presença de anticorpo para o método Bethesda, e títulos acima de 0,3 UB no método Bethesda modificado [2,16,18].

As razões porque algumas pessoas desenvolvem inibidores e outras não, permanecem não esclarecidas, embora alguns estudos tenham sugerido que fatores genéticos tais como: tipo e gravidade da hemofilia [10, 30], tipo de mutação [26,31,32], etnicidade [33,34], história familiar de inibidores [33,35], genes de resposta imune [36-43]; e não genéticos como: idade do primeiro tratamento, intensidade do tratamento, infusão contínua e diferentes produtos [19,44-47], influenciam no desenvolvimento dos inibidores do FVIII da coagulação.

1.10 Fatores ambientais

1.10.1 Tratamento, Idade da primeira exposição, Tipos de produtos

Dentre os fatores de risco não genéticos, informações referentes ao tratamento já foram relacionadas. De modo geral, o desenvolvimento do inibidor surge em sua maioria, depois das primeiras exposições ao fator VIII. De fato, mais de 50% dos inibidores desenvolvem-se dentro de 15 dias da primeira exposição, podendo se manifestar depois de 2-195 dias da exposição [18,19,47,48]. Os riscos relativos aos tipos de produtos usados no tratamento dos pacientes (concentrado de FVIII recombinante ou derivado de plasma) geram controvérsias. Um estudo mostrou que o uso terapêutico de FVIII recombinante aumenta, em cerca, de 2,4 vezes o risco de desenvolver inibidores se comparado ao uso de FVIII plasmático [46].

1.11 Fatores genéticos

1.11.1 Gravidade da hemofilia

A gravidade da doença parece ser um dos fatores mais importantes observados. De fato, a formação do inibidor é principalmente uma complicação de Hemofilia A grave, 90% dos inibidores ocorrem entre os 50% de pessoas com hemofilia A grave [19]. Outras pesquisas relatam que a incidência de inibidor é de 21% a 52%, entre pacientes com hemofilia A grave, e de 21% e 33% quando em conjunto com hemofilia A moderada, sendo menos frequente entre os outros níveis (moderado e leve) [18,29].

1.11.2 Etnia e História de inibidores na família

A etnia foi associada à predisposição de desenvolvimento do inibidor. Um estudo mostrou que os americanos com descendência africana apresentavam um risco maior de desenvolvimento de inibidores [31]. Essa associação com os Africanos também foi mostrada por um estudo, o qual investigou as predisposições genéticas ao desenvolvimento do inibidor, incluindo a etnia e história de inibidor na família. Os resultados mostraram que a incidência de inibidores encontrava-se elevada no subgrupo de pessoas com descendência africana, quando comparados aos caucasóides (27,4% vs. 55,6%). Ainda, de acordo com esse estudo, foi observado que o risco para formação de inibidor aumentou significativamente em pacientes com história familiar de inibidores; das 388 famílias analisadas, 48% dos pacientes positivos para o inibidor tinham história familiar de inibidores, comparados aos 15% dos pacientes sem história familiar de inibidores (RR = 3,2) [33].

Num estudo realizado com 113 famílias com dois ou mais irmãos positivos para o inibidor, no qual foram estudadas as alterações genéticas e o desenvolvimento de inibidores em irmãos com Hemofilia A grave, foi observado que 69,9% dos pacientes positivos para o inibidor tinham irmãos também positivos [26]. Fatores ambientais, tais como infecções e o tipo de tratamento, influenciam a resposta imune e, portanto, o risco de desenvolver inibidores em cada família. Entretanto, é improvável que estes fatores não genéticos possam por si próprios explicar as concordâncias encontradas. Estas observações sugerem que deve haver diferenças fundamentais na resposta imune que podem estar baseadas em marcadores genéticos [16].

1.11.3 Mutações no gene do Fator VIII

Até o ano de 2007, foram relatados mais de 1200 tipos de mutações associadas à doença, pelo banco de dados eletrônico HAMSTeRS. O grupo com maior risco de produzir anticorpos

anti-FVIII é aquele em que os indivíduos apresentam maiores alterações no gene, tais como mutações sem sentido, inversões ou grandes deleções [26,32,35]. Na Hemofilia A, as mutações que estão mais associadas com o risco de desenvolver inibidores, é a mutação por inversão do íntron 22 (30-50%) e íntron 1 (2-5%) [24]. Num estudo feito no México, foram analisadas as mutações por inversão no íntron 1 em 94 pacientes, onde nenhum paciente apresentou a mutação, mas 45% (14/31) dos pacientes, selecionados ao acaso, apresentavam a mutação no íntron 22. Foram realizados testes para detecção do inibidor em 28 desses 31 pacientes, resultando em 8 (29%) pacientes com inibidor [49]. Semelhantes resultados foram encontrados dentre 101 mutações investigadas nos pacientes hemofílicos da Índia, sendo que as principais mutações foram 2% inversões no íntron 1 e 51% no íntron 22 [50]. No Brasil, num estudo com 86 pacientes brasileiros caucasianos com hemofilia A, foram investigados a ocorrência de mutações por inversão em 47 pacientes. Destes, 33 (70%) eram portadores de Hemofilia grave e 14 (30%) moderado ou leve. No subgrupo classificado como grave, observou-se um aumento da frequência da mutação por inversão (13/33, 39.4%), sendo a maioria (11/13, 86.4%) mutação no íntron 22 [51]. Um estudo de levantamento bibliográfico, envolvendo diversas populações da Europa e das Américas, observou que estas frequências de mutações foram semelhantes em diversas populações [52]. Num estudo realizado entre famílias (Tabela 1), os pesquisadores demonstraram que, embora dados evidenciassem que a mutação por inversão no íntron 22 estivesse associada com o desenvolvimento de inibidor, muitos pacientes que também apresentam essa mutação, não desenvolveram o inibidor, pois somente 65 (43,3%) dos pacientes com esta mutação tinham presença de inibidor [35].

Tabela 1. Frequência de mutações em famílias estudadas por Astermark et al. (2005)

Tipo de mutação	Número de famílias	%
Inversão íntron 22	74	65,5
Sem sentido (<i>Nonsense</i>)	14	12,4
De sentido trocado (<i>Missense</i>)	9	8,0
Grande deleção/inserção	4	3,5
Pequena deleção/inserção	9	8,0
Mutação no local de <i>splicing</i>	3	2,6
Total	113	100

1.11.4 Polimorfismos nos genes das citocinas

As citocinas são proteínas secretadas pelas células da imunidade inata e adaptativa. Adicionalmente, polimorfismos funcionais de citocinas anti e pró-inflamatórias são importantes moduladores da resposta imune. O não balanceamento na secreção de citocinas pode afetar o curso da resposta imune iniciada pela exposição do FVIII proteico. Expressões e

produções de citocinas são, em parte, geneticamente determinadas [43]. Os polimorfismos dos genes das interleucinas (IL)-1 β , IL-4 e IL-10 são conhecidos pela influência na produção de anticorpos nas doenças auto-imunes. Foram estudadas associações destes polimorfismos com o desenvolvimento do inibidor em pacientes com hemofilia A. Houve associação positiva, apenas com o alelo *IL10*+134G, o qual foi identificado em 44 (26,8%) dos 164 indivíduos estudados. Trinta e dois (72,7%) desses 44 pacientes tinham anticorpo anti-FVIII, comparados com 45 (37,5%) dos 120 pacientes sem o alelo. Dentre os 77 pacientes com história de inibidor na família, 32 (41,6%) também eram positivos para este alelo comparados com 12 (13,8%) dos 87 pacientes sem inibidor na família ($P = 0,001$; OR = 4,4). Uma associação também significativa para o alelo *IL10*+134G foi observada no subgrupo de pacientes com Hemofilia A severa ($P = 0,001$; OR = 5,4) [42].

O TNF- α é uma importante citocina com funções imunomoduladoras, que desempenha uma potente ação pró-inflamatória e estimula a produção de outras citocinas e moléculas de adesão, na ativação de neutrófilos e células T e na produção de anticorpos pelas células B. O polimorfismo desse gene tem sido associado com doenças auto-imunes mediadas por anticorpos [25,41,53]. Foi realizado um estudo que analisou polimorfismos em 4 alelos do gene *TNF* (-827C>T, -308G>A, -238A>G e 670A>G) em 164 pacientes hemofílicos A (124 grave, 26 moderada e 14 leve) e 78 famílias com Hemofilia A.

Neste estudo, foi observada apenas a associação do genótipo -308A/A com a formação de inibidores. O alelo -308A foi identificado em 46 (59,7%) dos 77 pacientes com inibidor e em 40 (46,0%) dos 87 pacientes sem inibidor ($P = 0,87$; OR = 1,7). A associação entre o genótipo -308A/A e a formação de inibidores foram também estatisticamente significativos no subgrupo de pacientes (124) com Hemofilia grave ($P < 0,001$; OR = 19,2) [41]. Em recente estudo, resultados foram semelhantes a esses apresentados [43].

1.11.5 Sistema HLA de classe I e II

O sistema imune desenvolveu-se para proteger o indivíduo. Para atuar efetivamente, o sistema imune deve distinguir entre antígenos contra os quais uma resposta imune seria benéfica e aqueles contra os quais esta se torna perniciosa [54].

Na espécie humana, os genes do MHC (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) recebem a denominação de HLA (do inglês, *Human Leukocyte Antigen*), o qual está localizado no braço curto do cromossomo 6. O HLA ocupa um grande segmento de DNA, em torno de, 3.500 quilobases (Kb). Esses locos genéticos contêm a maior parte da informação necessária para o desenvolvimento da atividade de apresentação de antígenos.

A função fisiológica das moléculas do MHC está relacionada com a apresentação de peptídeos às células T. De fato, as moléculas do MHC são componentes integrais dos ligantes que a maioria das células T reconhece, pois os receptores de antígenos das células T são específicos para complexos peptídeos antigênicos e moléculas MHC do hospedeiro. Existem dois tipos principais de produtos dos genes MHC, chamados de moléculas de Classe I e moléculas de Classe II (Figura 7), que apresentam diferentes tipos de antígenos proteicos, antígenos citossólicos (intracelulares) e extracelulares. Assim, as células T CD4+ (geralmente auxiliares) reconhecem antígenos em conjunto com moléculas de classe II, enquanto as células CD8+ (geralmente citotóxicas) reconhecem antígenos das moléculas de Classe I [54,55,56].

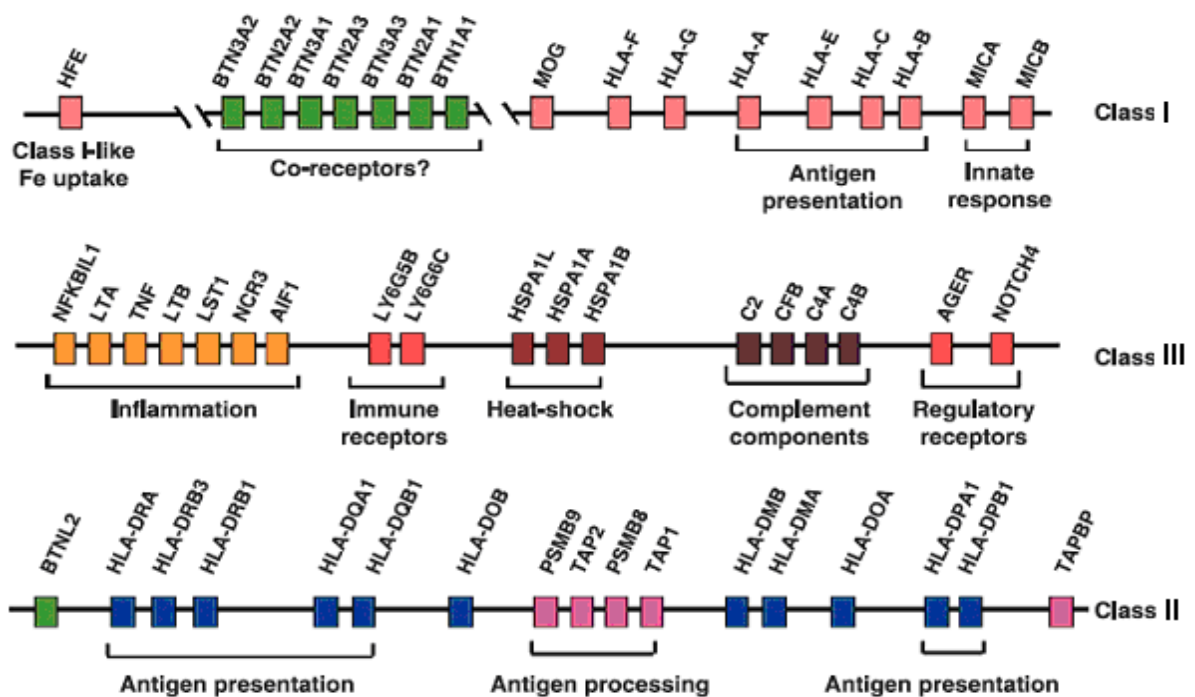


Figura 7. Mapa resumido do MHC humano ilustrando o agrupamento de genes do sistema imunológico.

Fonte: Traherne, 2008 [55].

Entre os grupos de genes das classes I e II, existem genes que codificam vários componentes do sistema complemento e três citocinas estruturalmente relacionadas, o TNF- α (fator de necrose tumoral), a linfotóxina- α e a linfotóxina- β . Os genes do MHC que codificam essas proteínas foram denominados MHC de classe III.

A geração de anticorpos para antígenos peptídicos ligados ao FVIII envolve uma cooperação celular que resulta na apresentação do antígeno ao Linfócito T (LyT) e linfócito B (LyB). O processo inicial é derivado do processamento de proteínas pelas células apresentadoras de antígeno (APC) e, posterior associação destes peptídeos com moléculas HLA presentes nestas células. Para proteínas extracelulares como o FVIII exógeno usado em

pacientes com Hemofilia A, a molécula HLA de classe II é quem medeia o processamento dos peptídeos antigênicos [22].

Tentativas de identificar uma associação entre alguns haplótipos de HLA de classe I e II em relação ao risco de desenvolvimento do inibidor não foram conclusivas, contudo alguns estudos apresentaram fracas associações entre alguns haplótipos HLA I e II no desenvolvimento de inibidores.

Um estudo com 46 pacientes japoneses portadores de Hemofilia A, no qual 20 desses pacientes tinham inibidores, foram tipados para os antígenos HLA-A, B e Cw e para os alelos HLA-DQA1, DQB1, DRB1 e DPB1. Os resultados mostraram que a ausência do HLA-A24 seria o principal risco para formação do inibidor, quando comparados com aqueles sem inibidor (36,8% vs. 82,6%; $P = 0,003$; OR = 0,123). Ainda, de acordo com este estudo, os alelos HLA-DRB1*04, DQB1*04 e DQA*0301 podem estar associados com o desenvolvimento do inibidor [39].

Não foi observada nenhuma diferença significativa com HLA-Cw5 em pacientes japoneses. Entretanto, numa população americana, 44 pacientes com Hemofilia A, dos quais 28 não tinham inibidor e 16 eram positivos para inibidor; o HLA-Cw5 esteve frequente em 11 (39,29%) pacientes sem inibidor, enquanto que no grupo com inibidores, nenhum foi encontrado. Portanto, a ausência do HLA-Cw5 atuou como fator protetor no desenvolvimento do inibidor ($P < 0,02$) [36].

Num estudo realizado na Alemanha, foram caracterizados os alelos HLA de classe I (HLA-A, -B e -C) e II (HLA-DRB1, -DQA e -DQB) em 71 pacientes hemofílicos A, sendo 42 com inibidor e 29 sem inibidor e todos com o mesmo tipo de mutação - inversão no íntron 22. Não houve nenhuma forte associação significativa entre esses alelos e o desenvolvimento de inibidor. Entretanto, HLA-A*03, HLA-B*07, HLA-C*07, HLA-DQA*0102, HLA-DQB*0602 e HLA-DRB1*15 foram encontrados na maioria dos pacientes com inibidor, enquanto que HLA-C*02, DQA*0103, DQB*0603 e DRB1*13 foram encontrados em maior frequência em pacientes sem inibidor, sugerindo assim uma proteção contra o desenvolvimento de anticorpos contra o fator VIII. Embora fosse observada uma maior frequência destes alelos, estatisticamente não foram significativos, concluindo assim que apesar da molécula HLA classe II estar envolvida no mecanismo da formação desses inibidores neste trabalho, o polimorfismo do loco HLA-DQ e DR não contribuiu para o desenvolvimento de inibidores [38].

Em outro estudo, com 117 pacientes hemofílicos A, sendo 56 do tipo leve e com a presença da mutação Cis na Arg⁵⁹³, foi possível a genotipagem HLA de 45 pacientes (7 com

inibidor e 38 sem) caucasianos de origem Alemã. Todos os pacientes foram genotipados para HLA-DQB1 e HLA-DRB1/3/4/5. A frequência do HLA-DQB1*05 estava aumentada no grupo de pacientes com inibidor (57%), comparada àquela de pacientes sem inibidor (32%). HLA-DRB1*01 também estava aumentado em pacientes com inibidor (57%), comparado àqueles sem inibidor (21%). Porém, neste estudo, todos estes resultados não alcançaram significância estatística, sugerindo assim que o desenvolvimento de inibidores em crianças com Hemofilia A não teria relação com o perfil HLA classe II [40].

Similar resultado foi encontrado num grupo de 176 pacientes, no qual foi observado um aumento na frequência do haplótipo HLA-DRB*1501/DQB1*0602/DQA1*0102, em pacientes com inibidor, mas somente HLA-DQA1*0102 foi estaticamente significativo (OR = 2,7; IC = 1,2 - 5,9). HLA-DRB1*01, HLA-DQB1*0501 e DRB1*0101 também estavam aumentados no grupo de pacientes com inibidor, na presença da mutação inversão no íntron 22, mas também os valores não foram estatisticamente significativos [37].

Num estudo, onde foi analisado o polimorfismo do gene *TNF* e o HLA de classe I e II, foi verificada uma associação entre os alelos HLA-A*26 e B*44 com a produção do inibidor. O HLA-A*26 foi observado somente em pacientes hemofílicos A sem desenvolvimento de anticorpos contra FVIII (RR = 0,96; $P = 0,33$), mas a frequência observada deste alelo foi baixa. O alelo HLA-B*44 foi encontrado em 24 (31,2%) dos pacientes com inibidores (OR = 2,1; $P = 0,37$). Contudo, esses valores não foram estatisticamente significativos, conforme os valores de P apresentados [41].

No mais recente estudo realizado na Alemanha, numa amostragem maior de pacientes com Hemofilia A grave (130 pacientes com inibidor e 130 pacientes sem inibidor) e com o predomínio da mutação por inversão no íntron 22 no total dos pacientes (57,1%), os alelos HLA-DRB1*1501 e DQB1*0602 foram associados positivamente à formação do inibidor ($P = 0,0054$; OR = 1,99 e $P = 0,0117$; OR = 1,98, respectivamente) [43].

Embora alguns estudos tenham mostrado que o sistema HLA possa ser considerado como fator de risco para o desenvolvimento de inibidores, a associação entre HLA e a formação de inibidores do FVIII é diferente entre os diversos grupos étnicos avaliados e conforme a geografia. Tais dados podem ser úteis no reconhecimento de grupos de alto risco para a possível formação de inibidores nas diferentes populações.

JUSTIFICATIVA

A Hemofilia A é uma desordem hemorrágica que ocorre devido à deficiência do fator VIII (FVIII) que faz parte da cascata da coagulação. A terapêutica desta doença está baseada na administração do FVIII (liofilizado) logo após um sangramento, antes de cirurgias ou como profilaxia. No entanto, a administração desses fatores nos hemofílicos pode desencadear uma resposta imunológica humoral (desenvolvimento de inibidores/aloanticorpos) contra o fator recebido. O desenvolvimento de inibidores é atualmente a complicação mais grave do tratamento da hemofilia. O diagnóstico desta complicação deve ser investigado ativamente pela equipe de tratamento do paciente. O impacto dos inibidores no tratamento do paciente é nefasto, e a erradicação do mesmo deve ser o objetivo principal do tratamento. A identificação de fatores genéticos envolvidos na produção de inibidores por pacientes hemofílicos auxiliaria no reconhecimento de grupos de alto risco com predisposição genética para a formação destes anticorpos inibidores. Este estudo proporcionaria também um maior esclarecimento dos mecanismos envolvidos na produção de inibidores por alguns indivíduos e não por outros.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Estudar a associação entre genes HLA de Classe I e II e o risco de desenvolvimento do inibidor em pacientes com hemofilia A do Estado do Paraná, bem como relacionar outros fatores de riscos associados através de levantamentos epidemiológicos dos prontuários dos pacientes.

Objetivos específicos:

Em pacientes oriundos de Hemocentros Regionais de Maringá, Cascavel, Londrina, Curitiba e região, portadores de hemofilia A:

1. Identificar os alelos HLA de classe I (HLA-A, HLA-B e HLA-C) e II (HLA-DRB1, HLA-DQA1 e DQB1);
2. Estimar as frequências alélicas e genótípicas para estes genes polimórficos nesta população;
3. Avaliar, por meio de uma análise estatística adequada, uma associação destes genes de resposta imune com a produção de anticorpos anti-fator VIII da coagulação;

4. Fazer levantamento dos dados dos pacientes através dos prontuários como: idade, raça, gravidade da doença, outras doenças relacionadas, parentescos entre os pacientes, tipos de produtos de concentrados de fatores usados, diagnósticos de inibidores e quantificação dos inibidores, quando diagnosticadas anteriormente ao desenvolvimento da pesquisa.

Referências

1. Caio MV, Silva RBP, Magna LA, Ramalho AS. Genética Comunitária e Hemofilia em uma População Brasileira. *Cad Saúde Pública* 2001; **17**: 595-605.
2. Brasil. Ministério da Saúde. *Hemofilia congênita e inibidor: manual de diagnóstico e tratamento de eventos hemorrágicos / Congenital hemophilia and inhibitor: handbook of diagnosis and treatment of hemorrhagic event*, Brasília 2008. 1ª Reimpressão 2009. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/hemofilia_congenita_inibidor_diagnostico_tratamento.pdf Acessado em 26 de nov. de 2009.
3. Pio SF, Oliveira GC, Rezende SM. As bases moleculares da hemofilia A/ The molecular basis of hemophilia A. *Rev Assoc Med Bras* 2009; **55**: 213-9.
4. Bolton-Maggs PHB, Pasi KJ. Haemophilias A and B. *Lancet* 2003; **361**: 1801-09.
5. Giagrande PLF. The molecular basis of hemophilia. Molecular Hematology. In: Provan D, Gribben J 2nd edn. Oxford: *Blackwell Scientific Publications* 2007; 184-198.
6. Shen BW, Spiegel PC, Chang CH, Huh JW, Lee JS et al. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. *Blood* 2008; **111**: 1240-47.
7. Bowen DJ. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2002; **55**: 1-18.
8. Castaldo G, D'Argenio V, Nardiello P, Zarrili F, Sanna V et al. Haemophilia A: molecular insights. *Clin Chem Lab Med* 2007; **45**: 450-61.
9. Ngo JCK, Huang M, Roth DA, Furie BC, Furie B. Crystal Structure of Human Factor VIII: Implications for the Formation of the Factor IXa-Factor VIIIa. Complex. *Structure* 2008; **16**: 597-606.
10. White GC II, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J. 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. On behalf of the Factor VIII and Factor IX Subcommittee. Definitions in hemophilia. *Thromb Haemost* 2001; **85**; 560.

11. Brasil. Ministério da Saúde. *Manual de tratamento das coagulopatias hereditárias*. Brasília 2005. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/cpnsh/MANUAL%20COAGULOPATIASFINAL.doc>. Acessado em 26 de nov. 2009.
12. Carmo RA, Oliveira GC, Guimarães MDC, Oliveira MS, Lima AA, Buzek SC et al. Hepatitis C vírus infection among Brazilian hemophiliacs: a virological clinical and epidemiological study. *Bras J Med Biol Res* 2002; **35**: 589-98.
13. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n°23, de 24 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico sobre a indicação de uso de crioprecipitado. Diário Oficial da União; Poder Executivo de, 28 de janeiro de 2002.
14. Peres LVC, Succi RCM, Bensabath G, Soares MCP, Saraiva ASL. Hepatitis C virus (HCV) in children and adolescent hemophiliacs. *J Pediatr* 1998; **74**: 325-32.
15. Simanis R, Lejniece S, Sochnevs A, Eglite J et al. Natural clearance of hepatitis C virus in hemophilia patients. *Medicina (Kaunas)* 2008; **44** (1).
16. Chaves DG, Rodrigues CV. Desenvolvimento de inibidores do fator VIII na hemofilia A. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2008.
17. Gringeri A. (Org.) *Normas para o tratamento dos pacientes com inibidores dos fatores de coagulação*. Tradução Elbio Antonio D'Amico. [S.l.]: Associação Italiana dos Centros de Hemofilia A.I.C.E., 2001.
18. Wight J, Paisley S. The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. *Haemophilia* 2003; **9**: 418-35.
19. Dimichele DM. Management of factor VIII inhibitors. *Int J Hematol* 2006; **83**: 119-125.
20. Ozelo MC, Villaça, PR, Almeida JOS, Bueno TMF, Miranda PAP, Hart WM et al. A cost evaluation of treatment alternatives for mild-to-moderate bleeding episodes in patients with haemophilia and inhibitors in Brazil. *Haemophilia* 2007; **13**: 462-9.
21. You CW, Lee SY, Park SK. Cost and effectiveness of treatments for mild-to-moderate bleeding episodes in haemophilia patients with inhibitors in Korea. *Haemophilia* 2009; **15**: 217-26.
22. White II GC, 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.

23. André S, Meslier Y, Dimitrov JD, Repessé Y, Kaveri SV et al. A cellular viewpoint of anti-FVIII immune response in hemophilia A *Clinic Rev Allerg Immunol* 2009; **37(2)**: 105-113.
24. Ghosh K, Shetty S. Immune response to FVIII in hemophilia A: an overview of risk factors. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2009; **37(2)**: 58-66.
25. Pratt KP, Thompson AR. B-Cell and T-Cell epitopes in anti-factor VIII immune responses. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2009; **37(2)**: 80-95.
26. Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia*. 2006; **6**: 15-22.
27. Zhang AH, Skupsky J, Scott DW. Factor VIII inhibitors: risk factors and methods for prevention and immune modulation. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2009; **37(2)**: 114-124.
28. Brand O, Stephen G, Heward J. HLA, CTLA-4 and PTPN22: the shared genetic master-key to autoimmunity? *Expert Rev Mol Med* 2007; **7**: 23.
29. Qian J, Collins M, Sharpe AH, Hoyer LW. Prevention and treatment of factor VIII inhibitors in murine hemophilia A. *Blood* 2000; **95**: 1324-9.
30. Giuffrida AC, Genesini S, Franchini M, Gironcoli M, Aprili G, Gandini G. Inhibitors in mild/moderate haemophilia A: two case reports and a literature review. *Blood* 2008; **6**: 163-8.
31. Gill JC. The role of genetics in inhibitor formation. *Thromb Haemost* 1999; **82**: 500-4.
32. Tuddenham EGD, Mcvey JH. The genetic basis of inhibitor development in haemophilia A. *Haemophilia* 1998; **4**: 543-5.
33. Astermark J, Berntorp E, White GC, Kroner BL, MIBS Study Group. The Malmö international brother study (MIBS): further support for genetic predisposition to inhibitor development in hemophilia patients. *Haemophilia* 2001; **7**: 267-72.
34. Viel KR, Ameri A, Aschire T, Iyer RV, Watts RG, Lutcher C et al. Inhibitors of factor VIII black patients with hemophilia. *N Engl J Med* 2009; **360**: 1618-27.
35. Astermark J, Oldenburg J, Escobar M, White GC, Berntorp E. The Malmö International Brother Study (MIBS). Genetic defects and inhibitor development in siblings with severe hemophilia A. *J Haematol*. 2005; **90**: 924-30.
36. Aly AM, Aledort LM, Lee TG, Hoyer, LW. Histocompatibility antigen patterns in haemophilic patients with factor VIII antibodies. *Br J Haematol* 1990; **76**: 238-41.
37. Hay CR, Ollier W, Pepper L 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**: 234-7.

38. 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**: 238–42.
39. Otha H, Takahashi I, Kojima T et al. Histocompatibility antigens and alleles in Japanese haemophilia A patients with or without factor VIII antibodies. *Tissue antigens* 1999; **54**: 91-7.
40. Brill WS, Maclean PE, Kaijen PHP et al. HLA class II genotype and factor VIII inhibitors in mild haemophilia A patients with an Arg593 to Cys mutation. *Haemophilia* 2004; **10**: 509-14.
41. Astermark J, Oldenburg J, Carlson J et al. Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 2006; **108**: 3739–45.
42. Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, Lefvert AK, MIBS Study Group. Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 2006; **107**: 3167–72.
43. Pavlova A, Delev D, Lacroix-Desmazes S, Schwaab R, Mende M et al. Impacto of polymorphisms of the MHC class II, IL-10, TNF-a and CTLA-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A. *Thromb Haemost* 2009. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/26883759_Impact_of_polymorphisms_of_the_MHC_class_II_IL-10_TNF-a_and_CTLA-4_genes_on_inhibitor_development_in_severe_hemophilia_A Acessado em: 01 de nov de 2009.
44. Ragni MV, Ojeifo O, Feng J, Yan J, Hill KA, Sommer SS et al. Risk factors for inhibitor formation in hemophilia: A prevalent case-control study. *Haemophilia* 2009; **15**: 1074-82
45. Goodeve AC, Williams I, Bray GL, Peake IR. Relationship between factor VIII mutation type and inhibitor development in a cohort of previously untreated patients treated with recombinant factor VIII (recombinate). Recombinate PUP study group. *Thromb Haemost* 2000; **83**: 844–8.
46. Goudemand J, Rothschild C, Demiguel V, Vinciguerrat C, Lambert T et al. Influence of 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.
47. Kempton CL, White GC II. How we treat a hemophilia A patient with a factor VIII inhibitor. *Blood* 2009; **113**: 11-7.

48. Lusher JM. Factor VIII inhibitors with recombinant products: prospective clinical trials. *Haematologica* 2000; **85** (Suppl. 10): 2-6.
49. Mantilha-Capacho JM, Beltrán-Miranda CP, Luna-Záizar H, Aguilar-López L, Esparza-Flores MA, López-Guido B et al. Frequency of intron 1 and 22 inversions of Factor VIII gene in Mexican patients with severe hemophilia A. *Am J Hematol* 2007; **82**: 283-287.
50. Jayandharan G, Shaji RV, Baidya S, Nair SC, Chandy M, Srivastava A. Identification of factor VIII gene mutations in 101 patients with haemophilia A: mutation analysis by inversion screening and multiplex PCR and CSGE and molecular modelling of 10 novel missense substitutions. *Haemophilia*. 2005; **5**: 481-91.
51. Soares RPS, Chamone DAF, Bydlowski P. Factor VIII gene inversions and polymorphisms in Brazilian Patients With Haemophilia A: carrier detection and prenatal diagnosis. *Haemophilia* 2001; **7**: 299-305.
52. Rossetti LC, Candela M, Bianco RP, Western M. et al. Analysis of factor VIII gene intron 1 inversion in Argentinian families with severe haemophilia A and a review of the literature. *Blood Coag & Fibrinolysis*. 2004; **15**: 569-72.
53. CAVALEIRO, João; Fonseca E. Gene fo TNFA e Artrite Reumatóide: prognóstico e farmacogenética onde estamos e para onde vamos? *Ac Reumatol P* 2004; **29**: 233-42.
54. SCHWARTZ, Benjamin. **Imunologia Básica**. Editora Prentice – Hall do Brasil LTDA. Cap 4, p 35-46, 1991.
55. Traherne JA, Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies. *In J Immunogenetics* 2008; **35**: 179-92.
56. Mazza C, Malissen B. What guides MHC-restricted TCR recognition? *Sem Immunology* 2007; **19**: 225-53.

HAMSTeRS- Database web - Disponível em: The Haemophilia A mutation, Structure, Test and Resource Site (<http://europium.csc.mrc.ac.uk>).

CAPÍTULO II

Artigo: “Influência dos alelos HLA de Classe I e II no desenvolvimento do inibidor em pacientes com Hemofilia A do Sul do Brasil.”

Influência dos alelos HLA de Classe I e II no desenvolvimento do inibidor em pacientes com Hemofilia A do Sul do Brasil

Influence of HLA Class I and II alleles on inhibitor development in hemophilia A patients from the South of Brazil

Morgana Ferreira de Barros*, Juliana Curi Martinichen Herrero*, Ana Maria Sell[£], Fabiano Cavalcante de Melo[£], Marco Antonio Braga[£], Cinthia Barbosa Pelissari[†], Júlio Machado[†], Sandra de Souza Schiller[‡], Loide de Souza Hirle[‡], Jeane Eliete Laguila Visentainer[£]

*Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR, Brasil

†Laboratório de Hematologia, Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR), Curitiba/PR, Brasil

£Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR, Brasil

‡Hemocentro Regional de Maringá, Maringá/PR, Brasil

Título Resumido:

HLA e risco de inibidor na Hemofilia A

Endereço para correspondência:

Jeane Eliete Laguila Visentainer

Departamento de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Estadual de Maringá

Av. Colombo, 5790; Maringá – PR – Brasil, CEP: 87020-900

Tel: (44) 3011-4864

Fax: (44) 3011-4931

e-mail: jelvisentainer@uem.br; jelvisentainer@gmail.com

Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos. Registrado no CONEP em 10/02/1998. N° do Parecer = 256/2007.

Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná/Hospital do Trabalhador. Registrado em 22/07/2008 e aprovado em 28/07/08. N° do Processo = 031/2008.

Resumo

Introdução: A Hemofilia A congênita é uma doença ligada ao cromossomo X causada pela deficiência ou diminuição da atividade pró-coagulante do Fator VIII (FVIII). Durante o tratamento, alguns pacientes desenvolvem aloanticorpos (inibidores) que neutralizam a ação do FVIII administrado exogenamente. Atualmente, a presença do inibidor é o mais sério evento adverso encontrado na terapia de reposição. Alguns estudos têm sugerido que fatores genéticos influenciam no desenvolvimento dos inibidores do FVIII de coagulação. **Objetivo:** Identificar os alelos de classe I e II que possam influenciar na formação dos inibidores. **Métodos:** Foram realizadas as genotipagens dos alelos de Classe I (HLA-A, -B e -C) e Classe II (HLA-DRB1, -DQA1 e -DQB1) de 171 pacientes com Hemofilia A, inclusos os 40 pacientes que tinham anticorpos contra o fator VIII. **Resultados:** HLA-A*03 (OR = 2,1; $P = 0,0432$), HLA-B*42 (OR = 6,84; $P = 0,0285$), HLA-C*16 (OR = 5,23; $P = 0,0192$) e HLA-DRB1*14 (OR = 3,49; $P = 0,0245$) foram associados positivamente com a formação do inibidor. **Conclusões:** Estes resultados confirmam que o HLA está envolvido na produção do inibidor e poderiam ser usados como uma ferramenta para reconhecer grupos de alto risco para um possível desenvolvimento de inibidores entre pacientes hemofílicos do Sul do Brasil.

Palavras-chave: Hemofilia A, inibidores, HLA.

Abstract

Introduction: Congenital Hemophilia A is a chromosome-linked disorder due to the deficiency or reduction of factor VIII (FVIII) procoagulant activity. During treatment, some patients develop alloantibodies (FVIII inhibitors) that neutralize the action of exogenously administered FVIII. Currently, the presence of these inhibitors is the most serious adverse event found in replacement therapy. Some studies have suggested that genetic factors influence the development of the FVIII inhibitors of coagulation. **Aim:** To identify the Class I and II alleles that may be influencing the formation of inhibitors. **Method:** Genotyping of the Class I (HLA-A, -B and -C) and Class II (HLA-DRB1, -DQA1 and -DQB1) alleles of 171 patients with Hemophilia A, including 40 who had developed antibodies to factor VIII was performed. **Results:** After the comparison of the hemophilia group without inhibitors and the hemophilia group with inhibitors, HLA-A*03 (OR = 2,10; $P = 0,0432$), HLA-B*42 (OR = 6,84; $P = 0,0285$), HLA-C*16 (OR = 5,23; $P = 0,0192$) and HLA-DRB1*14 (OR = 3,49; $P = 0,0245$) were positively associated with the formation of the inhibitors. **Conclusion:** These results confirm that HLA is involved in inhibitor production and could be used as a tool for recognition of groups at high risk of a possible inhibitor development among Southern Brazilian hemophilic patients.

Keywords: Hemophilia A, inhibitors, HLA.

Introdução

A Hemofilia A congênita é uma doença hemorrágica de herança ligada ao cromossomo X causada pela deficiência ou diminuição da atividade pró-coagulante da glicoproteína Fator VIII (FVIII), sendo caracterizada por manifestações hemorrágicas clinicamente variáveis dependentes da quantidade de fator presente no plasma [1,2]. A incidência das hemofilias nos diversos grupos étnicos é de, aproximadamente, 1:10.000 nascimentos masculinos. Atualmente, no Brasil temos 6.881 (62,7%) pacientes com Hemofilia A e 1291 (11,7%) pacientes com Hemofilia B, 705 destes pacientes com inibidor, sendo 9,9% hemofílicos A e 1,9% hemofílicos B [3].

O tratamento consiste na reposição do fator deficiente através de transfusão de concentrado de FVIII plasmático humano liofilizado (pdFVIII) ou FVIII recombinante (rFVIII) [4,5,6]. Alguns pacientes desenvolvem inibidores durante o tratamento (aloanticorpos frequentemente da classe IgG1 e IgG4), os quais neutralizam a ação do FVIII administrado exogenamente, impedindo seu efeito hemostático [7,8]. A incidência é de 18% a 28% e a prevalência de 7% a 18% [5,7,8].

Em adição às complicações como artropatias, problemas relacionados ao acesso venoso, hepatites virais e HIV, a formação do inibidor é atualmente o mais sério evento adverso encontrado na terapia de reposição [9]. Quando isto ocorre, o tratamento torna-se mais caro e aumenta a taxa de mortalidade e morbidade [10]. As razões porque algumas pessoas desenvolvem inibidores e outras não, permanecem não esclarecidas, embora alguns estudos tenham sugerido que fatores genéticos tais como: tipo e gravidade da hemofilia [1], tipo de mutação [11,12,13], etnicidade [14,15,16], história familiar de inibidores [15], genótipo do HLA [11,17-21]; e não genéticos como: idade do primeiro tratamento [22], intensidade do tratamento [23], infusão contínua e diferentes produtos [24] influenciam no desenvolvimento dos inibidores do FVIII da coagulação [25,26].

Várias linhas de pesquisa indicam que a resposta imune desencadeada pela presença do FVIII exógeno é um evento célula T-helper dependente que envolve células apresentadoras de antígeno (APC) e linfócitos B. Para que os linfócitos B produzam anti-FVIII específico, eles precisam passar por processos de maturação que exigem o auxílio de linfócitos T específicos. O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de Classe II tem um papel central no reconhecimento de peptídeos do FVIII apresentados pela APC [25,27,28]. Tentativas de identificar uma associação entre alguns haplótipos de HLA de Classe I e II em relação ao risco de desenvolvimento do inibidor não foram conclusivas [11,18,20,23,29].

Até o momento, não há dados referentes a associações entre HLA e hemofilia A no Brasil, o qual apresenta uma população miscigenada e com características distintas de outras populações já estudadas. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo obter mais informações sobre a influência dos alelos HLA de classe I e II no desenvolvimento do inibidor em pacientes com Hemofilia A Sul do Brasil.

Pacientes e Métodos

Pacientes

Pacientes com hemofilia A cadastrados no CoagulopatiasDATASUSweb Estado do Paraná participaram da pesquisa por meio dos Hemocentros Regionais de Maringá, Londrina e Cascavel, e do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR) de Curitiba, no período de 2007 a 2009. Dados como raça foram considerados de acordo com características/traços físicos do paciente. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá e pelo Comitê de Ética da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, Sul do Brasil.

De um total de 193 pacientes hemofílicos, 22 foram excluídos por apresentarem algum tipo de parentesco e serem HLA-haploidênticos ou idênticos com seu parente, permanecendo no estudo, um total de 171 pacientes. Inibidores de alta resposta foram definidos com um histórico de pico de título >5UB/mL e inibidores de baixa resposta foram definidos com um pico de título de 5UB/mL ou menor. A doença foi considerada grave quando o nível de FVIII foi menor que 1%; moderada, com nível de FVIII de 1% a 5% e leve quando o nível de FVIII foi maior que 5% e menor que 40% [1].

Metodologia

O DNA foi extraído a partir de amostras de sangue coletadas por punção venosa e armazenadas em tubos com EDTA, usando o kit EZ-DNA (Biological Industries, Beit Haemek, Israel). Os alelos HLA de Classe I (HLA-A, -B, -C) e de classe II (HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1) foram genotipados pela reação em cadeia da polimerase, com sequências específicas de oligonucleotídeos (PCR-SSO), usando o kit da One Lambda (San Diego, CA) e o sistema duo laser de citometria de fluxo LABScanTM100x (LuminexTM). A definição das genotipagens foi realizada com o programa HLA Fusion (One Lambda, Inc., San Diego, CA).

Análise Estatística

As frequências dos alelos foram comparadas entre os grupos usando o Teste exato de Fisher (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency2.cfm>). O risco (OR = Odds Ratio) e o intervalo de confiança de 95% foram calculados para as associações significativas (<http://www.braile.com.br/cientifica/pesqciem.htm>). Os valores de *P* foram considerados estatisticamente significativos quando menores que 0,05.

Resultados

Pacientes

No presente estudo, foram analisados 171 pacientes com Hemofilia A (1 a 71 anos). Quarenta pacientes apresentavam diagnóstico de presença do inibidor (2 a 61 anos) e 131 pacientes não o possuíam (1 a 71 anos). Entre os pacientes com Hemofilia A com presença do inibidor, houve uma frequência de 32 (80%) pacientes com inibidor de alta resposta e 8 (20%) pacientes de baixa resposta; em ambos os casos, a maioria dos pacientes foi considerada com hemofilia grave 30/32 e 6/8, respectivamente.

A gravidade da doença, quanto ao nível de fator VIII, foi analisada entre os grupos de pacientes com inibidor e sem inibidor conforme a Tabela 1. Em ambos os grupos, houve predomínio de pacientes graves, 36 (90%) e 86 (65,6%), respectivamente. A associação entre o nível grave e a presença do inibidor ($P = 0,0025$) e entre o nível leve e a ausência do inibidor ($P = 0,0135$) pôde ser observada.

Os grupos étnicos das populações com hemofilia A com e sem inibidor foram considerados mistos, devido à mistura de brancos, mulatos, negros e indígenas, com predomínio da raça branca 32 (80,0%) e 111 (84,7%), respectivamente. Ainda nessa questão, chama a atenção o fato que entre mulatos 7/21 (33,3%) apresentaram inibidor contra 32/143 (22,4%) dos caucasoides. No entanto, isso fica menos expressivo se considerar mulatos mais negros, onde 7/25 (28%) desenvolveram inibidor. A distribuição dos grupos étnicos nos grupos com hemofilia A está apresentada na Tabela 1.

Além do possível risco do desenvolvimento do inibidor em pacientes com Hemofilia, durante o tratamento transfusional, antes da década de 90, outra complicação importante era o alto risco de contaminação pelos vírus da hepatite C e B e pelo HIV pós-transfusão. Diante desses fatos, a Tabela 1 mostra a prevalência dos tipos sorológicos em cada grupo de hemofílico A com e sem inibidor. A soropositividade para Hepatite C foi predominante nos dois grupos, 13 (32,5%) com inibidor e 65 (49,6%) sem inibidor. Nesses pacientes, é comum haver mais do que uma associação, por exemplo, 2 (5,0%) dos pacientes com inibidor e 17

(13,0%) dos pacientes sem inibidor apresentaram as duas hepatites associadas em suas sorologias; 5 (3,8%) dos pacientes sem inibidor também tinham associação com HCV e HIV e apenas 1 (0,8%) paciente apresentou os 3 associados. No grupo dos pacientes com inibidor, nenhum tinha sorologia positiva para HIV.

Frequências dos alelos HLA de Classe I e II

Para observar a homogeneidade da população, foram comparadas as frequências entre pacientes com Hemofilia A com inibidor e sem inibidor. As frequências de alelos de HLA de Classe I e II, em pacientes com inibidores e sem inibidores, estão apresentadas na Tabela 2 e 3, respectivamente. O alelo HLA-A*03 apresentou maior frequência em pacientes com inibidores do que naqueles sem inibidores (17,5% vs. 9,2%; $P = 0,044$; OR = 2,10). Os alelos HLA-B*42 (5% vs. 0,8%; $P = 0,0285$; OR = 6,84) e HLA-C*16 (7,5% vs. 0,8%; $P = 0,0192$; OR = 5,23) também estavam mais presentes no grupo de pacientes com inibidor do que naqueles sem inibidor. Em relação aos alelos do HLA de Classe II, apenas o DRB1*14 apresentou maior frequência no grupo com inibidor do que naqueles sem inibidor (8,8% vs. 2,7%; $P = 0,0245$; OR = 3,49). Dados como intervalos de confiança e resultados relevantes entre os outros grupos, podem ser observados nas Tabelas 2 e 3.

Discussão

Em diversas populações étnicas e geograficamente distintas já estudadas, a prevalência da hemofilia A é de 1:10.000 nascimentos masculinos, sendo a hemofilia A (clássica) responsável por 75% a 80% dos casos, e a hemofilia B, por 20% a 25% [3,30]. No Brasil, segundo dados estatísticos do cadastro de coagulopatias hereditárias, há 8.172 pacientes com hemofilia, sendo 62,7% com hemofilia A e 11,7% hemofílicos B. A prevalência de inibidor nesta população é de, aproximadamente, 11,8% [3]. No Estado do Paraná, onde foi realizado o estudo, estão registrados, aproximadamente, 687 hemofílicos, sendo 83% hemofílicos A e 17% hemofílicos B, com prevalência do inibidor de, até o momento, 6,6%. A prevalência dos inibidores anti-FVIII, apontada na literatura, é de 5% a 7% em pacientes com hemofilia e de 12% a 13% entre hemofílicos A grave [8].

Vários fatores de riscos para o desenvolvimento do inibidor, tanto de caráter genético e ambientais, foram apresentados por diversos estudos. A gravidade da doença parece ser um dos fatores mais importantes, pois 90% dos inibidores ocorrem entre os 50% de pessoas com hemofilia A grave [5]. Outras pesquisas relatam a incidência de inibidor de 21% a 52%, entre pacientes com hemofilia A grave, e de 21% e 33% quando em conjunto com hemofilia A

moderada, sendo menos frequentes entre os outros níveis (moderado e leve) [7,31]. Em nosso estudo, dos 40 pacientes com diagnóstico de inibidor, 90% tinham níveis plasmáticos de FVIII menor que 1%, considerados como grave.

Dentre os fatores de risco não genéticos, informações referentes ao tratamento já foram relacionadas. De modo geral, o desenvolvimento do inibidor surge em sua maioria, depois das primeiras exposições ao fator VIII. De fato, mais de 50% dos inibidores desenvolvem-se dentro dos primeiros 15 dias de exposição, podendo se manifestar depois de 2-195 dias de exposição [23,24,25,32]. Os riscos relativos aos tipos de produtos usados no tratamento dos pacientes (concentrado de FVIII recombinante ou derivado de plasma) geram controvérsias. Um estudo mostrou que o uso terapêutico de FVIII recombinante aumenta, em cerca, de 2,4 vezes o risco de desenvolver inibidores se comparado ao uso de FVIII plasmático [12,32]. Nessa população estudada, mais de 95% dos pacientes foram expostos exclusivamente ao pdFVIII, já que o uso de rFVIII no Brasil é ainda muito recente e limitado[3], motivo pelo qual essa análise não pode ser realizada.

A respeito da etnia, dados históricos sugerem que, a frequência do inibidor em indivíduos afro-americanos com Hemofilia A grave é duas vezes maior do que em caucasianos [14,15,16]. Neste estudo, a distribuição das frequências entre os grupos étnicos foi homogênea em todos os grupos, a qual pode ser justificada pela grande miscigenação brasileira devido a aspectos históricos [33,34]. A população do Paraná é predominantemente de origem europeia (80,5%), com uma pequena, mas significativa contribuição de genes africanos (12,5%) e ameríndios (7,0%) [35]. Em nosso estudo, os indivíduos foram considerados de grupo étnico misto, pois segundo Parra et al. (2003), no Brasil, a nível individual, a cor de pele determinada pela avaliação física é um pobre preditor da ancestralidade africana [36].

Estudos evidenciaram, que pacientes portadores de hemofilia A grave com história de inibidor na família têm um risco aumentado em desenvolver anticorpo contra o FVIII [15]. O irmão de um paciente hemofílico com presença de inibidor tem o risco de 50% de desenvolvê-lo, e se gêmeos, aumenta para 68%, enquanto que o risco num membro da família é de 10%, indicando a existência de predisposição genética [25,37].

Nosso estudo avaliou 7 famílias com pelo menos um indivíduo da família com história de inibidor. Dessas, somente 2 famílias apresentaram o inibidor em dois membros (tio e sobrinho) e nenhuma entre os irmãos. O que não caracterizou a predisposição genética de desenvolvimento do inibidor.

Duas importantes variáveis, as mutações no gene do FVIII e aquelas relativas aos genes da resposta imune, são candidatas moleculares como determinantes da predisposição para o desenvolvimento do inibidor [11,20,21]. No entanto, a explicação para essa provável associação depende do tipo de mutação associada a determinado genótipo HLA. Ou seja, o genótipo poderia não ser relevante em um determinado caso se a mutação associada ao diagnóstico de hemofilia A naquele caso fosse outro. Em nosso estudo, não foi possível relacionar o risco de desenvolver o inibidor de acordo com as mutações presentes no gene do FVIII. Na Hemofilia A, as mutações que estão mais associadas com o risco de desenvolver inibidores, é a mutação por inversão do íntron 22 (30-50%) e íntron 1 (2-5%) [25].

Considerando o importante papel do MHC na apresentação de antígenos peptídicos às células T, e estas, por sua vez, no auxílio aos linfócitos B para a produção de anticorpos [25,26,27], muitos estudos, na tentativa de identificar uma associação entre alguns haplótipos HLA de classe I e II em relação ao risco de desenvolvimento do inibidor foram realizados, mas a maioria não foi conclusiva [11,18,20,23].

Do ponto de vista imunológico, os alelos MHC de classe II foram sugeridos serem mais importantes do que os alelos MHC de classe I, na apresentação de peptídeos do FVIII aos linfócitos T [25,27,28]. Diante disso, alguns recentes trabalhos focaram a genotipagem no HLA de classe II e, para excluir a possibilidade de que o tipo de mutação envolvida no gene pudesse mascarar a associação entre o risco da formação do inibidor frente à resposta imunitária, somente incluíram pacientes hemofílicos com mutações pré-definidas (principalmente, a mutação no íntron 22) [11,18,20,23].

Estudos anteriores mostraram que variantes HLA de classe I: A3, B7 e Cw7 e de classe II: DR15, DQA1*0102 e DQB1*0602 foram mais frequentes nos grupos de pacientes hemofílicos graves com inibidor, comparados aos pacientes hemofílicos sem inibidor; no entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa [11,18]. Posteriormente, em outro estudo entre famílias, as variantes citadas acima mostraram uma distribuição homogênea em ambos os grupos; no entanto, o alelo HLA*A26 estava ausente no grupo com inibidores, (protetor) e o B*44 mais frequente, associado ao risco de desenvolver o inibidor [20].

Num estudo, envolvendo uma pequena amostragem de pacientes com hemofilia A leve (7 pacientes com inibidor e 38 pacientes sem inibidor), com a presença da mutação cis Arg593, as frequências dos alelos HLA-DQB1*05 e DRB1*01 foram maiores em pacientes com inibidor, mas sem diferença significativa [29]. Já em outro estudo, com maior número de pacientes com Hemofilia A grave (130 pacientes com inibidor e 130 pacientes sem inibidor) e com o predomínio da mutação por inversão no íntron 22 no total dos pacientes (57,1%), os

alelos HLA-DRB1*1501 e -DQB1*0602 foram associados positivamente à formação do inibidor ($P = 0,0054$; OR = 1,99 e $P = 0,0117$; OR = 1,98, respectivamente) [21].

Estudos que não relacionaram mutações presentes no gene do FVIII também mostraram frequências importantes, a variante HLA-Cw5 esteve ausente no grupo de pacientes hemofílicos A com inibidor (0/16) e numa frequência de 39,3% nos pacientes hemofílicos sem inibidor (11/28) [17]. Em japoneses com Hemofilia A, o risco de desenvolver o inibidor foi positivamente associado à maior frequência dos antígenos HLA-DR4, DQ4 e do alelo DQA1*0301 quando comparados a um grupo controle de indivíduos normais, mas não quando comparados com os pacientes hemofílicos sem inibidor [19]. Num estudo recente, realizado na Pensilvânia, não houve associações entre 14 alelos de HLA II encontrados e o desenvolvimento do inibidor [23].

No presente estudo, associações de alelos HLA Classe I e II foram observadas com os pacientes hemofílicos A que desenvolveram inibidor. Houve maiores frequências de HLA-A*03, B*42, C*16 e DRB1*14 em pacientes com inibidor quando comparados aos pacientes sem inibidor.

A alta frequência do alelo HLA-A*03 em pacientes com a produção do inibidor já foi observada em outros estudos, de diferentes regiões [11,18], o que mostra um padrão de distribuição entre as diferentes populações analisadas. Nossos resultados confirmam essa associação, pois esse alelo está presente em 17,5% dos pacientes com inibidores e em 9,2% daqueles sem inibidores, numa região onde a frequência observada para esse alelo foi de 8,2% entre indivíduos saudáveis [38].

O alelo HLA-B*42, o qual é mais encontrado em grupos étnicos de origem africana, apresentou maior frequência nos pacientes hemofílicos com inibidor (5%) do que naqueles sem o inibidor (0,8%). Na população do Estado do Paraná, mesmo com 12,5% de indivíduos de contribuição africana, as frequências desse alelo, em duas populações estudadas, foram de 0,8% e 1,4%, respectivamente [38,39]. No presente estudo, dos 4 pacientes com inibidor que possuíam o alelo B*42, 3 (75%) eram mulatos, o que sugere que esse alelo pode estar relacionado com a produção do inibidor em nossa região devido à ancestralidade africana.

A frequência de HLA-C*16 no grupo de hemofílicos com inibidor (7,5%) não foi diferente estatisticamente daquela de indivíduos da nossa região (5,5%) [38], contudo foi maior no grupo hemofílico com inibidor do que naquele sem inibidor (7,5% vs. 1,5%). Não há muitos estudos que mostrem a frequência desse alelo no Brasil, em Pernambuco (Nordeste do Brasil) essa frequência foi de 10,0% e em Ribeirão Preto (SP) de 4,8% [39].

HLA-DRB1*14 é um alelo encontrado com maior frequência em brancos brasileiros (5,8%-8,1%) do que na população caucasiana em geral (2,4%) [39]. Isso pode ser devido à miscigenação com negros e indígenas em nossa população. Nesse estudo, houve associação de DRB1*14 com a produção de inibidor, pois o alelo HLA-DRB1*14 foi mais frequente em pacientes com inibidores (8,8%), do que naqueles sem inibidor (2,7%). Embora a frequência de 8,8% esteja próxima à relatada em brancos brasileiros (5,8% a 8,1%) e a de 2,7% próxima a de brancos de outras populações (2,4%) [39], a presença desse alelo pode ter sido um fator a mais que contribuiu para o desenvolvimento do inibidor, pois os grupos com e sem inibidor eram homogêneos em relação à etnia.

Embora alguns estudos tenham mostrado que o sistema HLA possa ser considerado como fator de risco para o desenvolvimento de inibidores, a associação entre HLA e a formação de inibidores do FVIII é diferente entre os diversos grupos étnicos avaliados e conforme a geografia. Tais dados podem ser úteis no reconhecimento de grupos de alto risco para a possível formação de inibidores nas diferentes populações.

Contudo neste estudo, embora os resultados confirmem que alelos HLA estejam envolvidos na produção do inibidor e possam ser usados para reconhecer grupos de alto risco, com predisposição genética para o desenvolvimento de inibidores, há necessidade de uma confirmação em outras populações, com um número maior de pacientes hemofílicos, principalmente, daqueles produtores de inibidores.

Agradecimentos

Agradecemos à equipe de enfermagem e auxiliares do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná, em especial às enfermeiras Silvana Silva Lima, Viviane Mitie Hashimoto Hayashi e Karina Felisbino. Ao Centro de Hemoterapia de Londrina e sua chefia Dra Mariza Saito e ao Centro de Hemoterapia de Cascavel, em especial à chefe Silvana Maria Tomasi e à enfermeira Neusa Maria Cerioli. Especialmente a todos os pacientes hemofílicos que fizeram parte da pesquisa e a todos aqueles do Laboratório de Imunogenética da UEM que colaboraram com o estudo.

Referências

1. White GC II, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J. 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. On behalf of the Factor VIII and Factor IX Subcommittee. Definitions in hemophilia. *Thromb Haemost* 2001; **85**: 560-0.
2. Brasil. Ministério da Saúde. *Hemofilia congênita e inibidor: manual de diagnóstico e tratamento de eventos hemorrágicos / Congenital hemophilia and inhibitor: handbook of diagnosis and treatment of hemorrhagic event*, Brasília 2008. 1ª Reimpressão 2009. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/hemofilia_congenita_inibidor_diagnostico_tratamento.pdf Acessado em 26 de nov. de 2009.
 3. Rezende SM, Pinheiro K, Caram C, Genovez G, Barca D. Registry of inherited coagulopathies in Brazil: first report. *Haemophilia* 2009; **15**: 142-9.
 4. Brasil. Ministério da Saúde. *Manual de Tratamento das Coagulopatias Hereditárias*, Brasília 2005. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/cpnsh/MANUAL%20COAGULOPATIASFINAL.doc>. Acessado em 26 de nov. 2009.
 5. Dimichele DM. Management of factor VIII inhibitors. *Int J Hematol* 2006; **83**: 119-25.
 6. Kempton CL, White GC II. How we treat a hemophilia A patient with a factor VIII inhibitor. *Blood* 2009; **113**: 11-7.
 7. Gringeri A. (Org.) *Normas para o tratamento dos pacientes com inibidores dos fatores de coagulação*. Tradução Elbio Antonio D'Amico. [S.l.]: Associação Italiana dos Centros de Hemofilia A.I.C.E., 2001.
 8. Wight J, Paisley S. The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. *Haemophilia* 2003; **9**: 418-35.
 9. Bolton-Maggs PHB, Pasi KJ. Haemophilias A and B. *Lancet* 2003; **361**: 1801-09.
 10. Ozelo MC, Villaça, PR, Almeida JOS, Bueno TMF, Miranda PAP, Hart WM et al. A cost evaluation of treatment alternatives for mild-to-moderate bleeding episodes in patients with haemophilia and inhibitors in Brazil. *Haemophilia* 2007; **13**: 462-9.
 11. 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**: 238-42.
 12. Goodeve AC, Williams I, Bray GL, Peake IR. Relationship between factor VIII mutation type and inhibitor development in a cohort of previously untreated patients treated with recombinant factor VIII (recombinate). Recombinate PUP study group. *Thromb Haemost* 2000; **83**: 844-8.

13. Astermark J, Oldenburg J, Escobar M, White GC II, Berntorp E, Malmo International Brother Study Group. The Malmo International Brother Study (MIBS). Genetic defects and inhibitor development in siblings with severe hemophilia A. *Haematologica* 2005; **90**: 924-31.
14. Aledort LM, Dimichele DM. Inhibitors occur more frequently in African-American and Latino haemophiliacs. *Haemophilia* 1998; **4**: 68-8.
15. Astermark J, Berntorp E, White GC, Kroner BL, MIBS Study Group. The Malmo international brother study (MIBS): further support for genetic predisposition to inhibitor development in hemophilia patients. *Haemophilia* 2001; **7**: 267-72.
16. Viel KR, Ameri A, Aschire T, Iyer RV, Watts RG, Lutchter C et al. Inhibitors of factor VIII black patients with hemophilia. *N Engl J Med* 2009; **360**: 1618-27.
17. Aly AM, Aledort LM, Lee TG, Hoyer, LW. Histocompatibility antigen patterns in haemophilic patients with factor VIII antibodies. *Br J Haematol* 1990; **76**: 238-41.
18. Hay CR, Ollier W, Pepper L 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**: 234-7.
19. Otha H, Takahashi I, Kojima T et al. Histocompatibility antigens and alleles in Japanese haemophilia A patients with or without factor VIII antibodies. *Tissue antigens* 1999; **54**: 91-7.
20. Astermark J, Oldenburg J, Carlson J et al. Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 2006; **108**: 3739-45.
21. Pavlova A, Delev D, Lacroix-Desmazes S, Schwaab R, Mende M et al. Impacto of polymorphisms of the MHC class II, IL-10, TNF-a and CTLA-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A. *Thromb Haemost* 2009. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/26883759_Impact_of_polymorphisms_of_the_MHC_class_II_IL-10_TNF-a_and_CTLA-4_genes_on_inhibitor_development_in_severe_hemophilia_A Acessado em: 01 de nov de 2009.
22. Chalmers EA, Brown AS, Keeling D, Liesner R, Richards M et al. Early factor VIII exposure and subsequent inhibitor development in children with severe haemophilia A. *Haemophilia* 2007; **13**: 149-55.
23. Ragni MV, Ojeifo O, Feng J, Yan J, Hill KA, Sommer SS et al. Risk factors for inhibitor formation in hemophilia: A prevalent case-control study. *Haemophilia* 2009; **15**: 1074-82.

24. Goudemand J, Rothschild C, Demiguel V, Vinciguerrat C, Lambert T et al. Influence of 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.
25. Ghosh K, Shetty S. Immune response to FVIII in hemophilia A: an overview of risk factors. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2009; **37(2)**: 58-66.
26. Zhang AH, Skupsky J, Scott DW. Factor VIII inhibitors: risk factors and methods for prevention and immune modulation. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2009; **37(2)**: 114-24.
27. André S, Meslier Y, Dimitrov JD, Repessé Y, Kaveri SV et al. A cellular viewpoint of anti-FVIII immune response in hemophilia A. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2009; **37(2)**: 105-13.
28. Pratt KP, Thompson AR. B-Cell and T-Cell epitopes in anti-factor VIII immune responses. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2009; **37(2)**: 80-95.
29. Brill WS, Maclean PE, Kaijen PHP et al. HLA class II genotype and factor VIII inhibitors in mild haemophilia A patients with an Arg593 to Cys mutation. *Haemophilia* 2004; **10**: 509-14.
30. Pio SF, Oliveira GC, Rezende SM. As bases moleculares da hemofilia A/ The molecular basis of hemophilia A. *Rev Assoc Med Bras* 2009; **55**: 213-9.
31. Giuffrida AC, Genesini S, Franchini M, Gironcoli M, Aprili G, Gandini G. Inhibitors in mild/moderate haemophilia A: two case reports and a literature review. *Blood* 2008; **6**: 163-8.
32. Lusher JM. Factor VIII inhibitors with recombinant products: prospective clinical trials. *Haematologica* 2000; **85**(Suppl. 10): 2-6.
33. Silva JA, Santos MS, Guimarães PEM, Ferreira ACS, Bandelt HJ, Pena SDJ et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 2000; **67**: 444-61.
34. Silva DRC, Santos FR, Rocha J, Pena SDJ. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Genet* 2001; **68**: 281-6.
35. Probst CM, Bompeixe EP, Pereira NF, Dalalio MMO, Visentainer JEL, Tsuneto LT et al. HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Paraná, Brazil. *Hum Biol* 2000; **72**: 597-617.
36. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 177-82.
37. Chaves DG, Rodrigues CV. Desenvolvimento de inibidores do fator VIII na hemofilia A. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2008.

38. Franceschi DSA, Mazini PS, Rudnick CCC, Sell AM, Tsuneto LT, Melo FC et al. Association between killer-cell immunoglobulin-like receptor genotypes and leprosy in Brazil. *Tissue Antigens* 2008; **72**: 478-82.
39. New Allele Frequency Database: <http://www.allelefrequencias.net>. Middleton D, Menchaca L, Rood H, Komerofsky R. *Tissue Antigens* 2003; **61**: 403-7. Acessado em 04 de dez de 2009.

Tabela 1. Perfil dos Pacientes com Hemofilia A

Características	Hemofilia A		P
	Inibidor (+)	Inibidor (-)	
Gravidade da Hemofilia	N=40	N=131	
Grave	36 (90%)	86 (65,6%)	0,0025
Moderado	4 (10%)	28(21,4%)	0,1629
Leve	0 (0%)	17 (13%)	0,0135
Raça			
Branco	32 (80%)	111 (84,7%)	0,4718
Mulato	7 (17,5%)	14 (10,7%)	0,2743
Negro	0 (0%)	4 (3,1%)	0,5741
Branco x Indígena	1 (2,5%)	2 (1,5%)	0,5528
Sorologia			
Hepatite C (HCV)	13 (32,5%)	65 (49,6%)	0.0701
AIDS (HIV)	0 (0%)	6 (4,6%)	0.3378
Total Positiva	15 (37,5%)	68 (51,9%)	0.1479
Total Negativa	25 (62,5%)	63 (48,1%)	0.1479

Associações estatisticamente significantes estão apresentadas em negrito.

Tabela 2. Frequências de alelos HLA de Classe I em pacientes com Hemofilia A, com e sem inibidor.

Loco A	Hemofilia A		P
	Inibidor (+)	Inibidor (-)	Inibidor (+) vs. Inibidor (-)
A*01	9 (11,3%)	23 (8,8%)	0,5134
A*02	18 (22,5%)	67 (25,6%)	0,6584
A*03	14 (17,5%)	24 (9,2%)	0.044 (OR=2,10; IC=1,03-4,3)
A*11	4 (5%)	17 (6,5%)	0.7929
A*23	3 (3,8%)	13 (5%)	0.7718
A*24	6 (7,5%)	36 (13,7%)	0.1734
A*25	0 (0%)	2 (0,8%)	1
A*26	2 (2,5%)	7 (2,7%)	1
A*29	5 (6,3%)	8 (3,1%)	0.1924
A*30	7 (8,8%)	14 (5,3%)	0,2887
A*31	4 (5%)	24 (9,2%)	0,3504
A*32	1 (1,3%)	7 (2,7%)	0.6865
A*33	2 (2,5%)	5 (1,9%)	0.6676
A*34	0 (0%)	4 (1,5%)	0.5767
A*36	0 (0%)	1 (0,4%)	1
A*66	0 (0%)	1 (0,4%)	1
A*68	5 (6,3%)	7 (2,7%)	0.1608
A*69	0 (0%)	1 (0,4%)	1
A*74	0 (0%)	1 (0,4%)	1
Total	80	262	
Loco B			
B*07	7 (8,8%)	22 (8,4%)	1
B*08	6 (7,5%)	11 (4,2%)	0,2445
B*13	2 (2,5%)	2 (0,8%)	0,2342
B*14	1 (1,3%)	11 (4,2%)	0.3079
B*15	9 (11,3%)	28 (10,7%)	0,8397
B*18	2 (2,5%)	15 (5,7%)	0.3789
B*27	0 (0%)	6 (2,3%)	0.3424
B*35	12 (15%)	39 (14,9%)	1
B*37	0 (0%)	0 (0%)	1
B*38	1 (1,3%)	4 (1,5%)	1
B*39	1 (1,3%)	11 (4,2%)	0.3079
B*40	6 (7,5%)	12 (4,6%)	0.3884
B*41	1 (1,3%)	4 (1,5%)	1
B*42	4 (5%)	2 (0,8%)	0.028 (OR=6,84; IC=1,23-38,1)
B*44	8 (10%)	29 (11,1%)	1
B*45	1 (1,3%)	4 (1,5%)	1
B*47	0 (0%)	0 (0%)	1
B*48	1 (1,3%)	2 (0,8%)	0,5516

B*49	3 (3,8%)	7 (2,7%)	0.7043
B*50	2 (2,5%)	8 (3,1%)	1
B*51	7 (8,8%)	19 (7,3%)	0.6346
B*52	3 (3,8%)	6 (2,3%)	0.4417
B*53	2 (2,5%)	6 (2,3%)	1
B*55	1 (1,3%)	1 (0,4%)	0.4136
B*56	0 (0%)	0 (0%)	1
B*57	0 (0%)	9 (3,4%)	0.1234
B*58	0 (0%)	3 (1,1%)	1
B*78	0 (0%)	0 (0%)	1
B*81	0 (0%)	1 (0,4%)	1
Total	80	262	
Loco C			
C*01	1 (1,3%)	12 (4,6%)	0.3136
C*02	3 (3,8%)	22 (8,4%)	0.2209
C*03	13 (16,3%)	26 (9,9%)	0,1574
C*04	18 (22,5%)	56 (21,4%)	1
C*05	2 (2,5%)	15 (5,7%)	0.3789
C*06	4 (5%)	18 (6,9%)	0,7946
C*07	18 (22,5%)	62 (23,7%)	0,8811
C*08	1 (1,3%)	8 (3,1%)	0.6910
C*12	2 (2,5%)	15 (5,7%)	0.3789
C*14	1 (1,3%)	5 (1,9%)	1
C*15	6 (7,5%)	12 (4,6%)	0.3884
C*16	6 (7,5%)	4 (1,5%)	0.013 (OR=5,23; IC=1,4-19,0)
C*17	4 (5%)	5 (1,9%)	0.2221
C*18	1 (1,3%)	2 (0,8%)	0.5516
Total	80	262	

Associações estatisticamente significantes estão apresentadas em negrito.

Tabela 3. Frequências de alelos HLA de Classe II em pacientes com Hemofilia A, com e sem inibidor.

Loco DRB1	Hemofilia A		P
	Inibidor (+)	Inibidor (-)	Inibidor (+) vs. Inibidor (-)
DRB1*01	5 (6,3%)	23 (8,8%)	0.6418
DRB1*03	8 (10%)	22 (8,4%)	1
DRB1*04	8 (10%)	35 (13,4%)	0.5635
DRB1*07	8 (10%)	27 (10,3%)	1
DRB1*08	7 (8,8%)	18 (6,9%)	0.6238
DRB1*09	0 (0%)	4 (1,5%)	0.5767
DRB1*10	4 (5%)	3 (1,1%)	0.0548
DRB1*11	7 (8,8%)	40 (15,3%)	0.1929
DRB1*12	1 (1,3%)	8 (3,1%)	0.6910
DRB1*13	12 (15%)	29 (11,1%)	0,332
DRB1*14	7(8,8%)	7 (2,7%)	0.0245(OR=3,49;IC=1,19-10,3)
DRB1*15	12 (15%)	30 (11,5%)	0.4366
DRB1*16	1 (1,3%)	16 (6,1%)	0.1364
Total	80	262	
Loco DQA1			
DQA1*01	38 (47,5%)	98 (37,4%)	0,1181
DQA1*02	8 (10%)	27 (10,3%)	1
DQA1*03	9 (11,3%)	40 (15,3%)	0.4666
DQA1*04	5 (6,3%)	16 (6,1%)	1
DQA1*05	19 (23,8%)	79 (30,2%)	0,323
DQA1*06	1 (1,3%)	2 (0,8%)	0.5516
Total	80	262	
Loco DQB1			
DQB1*02	13 (16,3%)	46 (17,6%)	0,8668
DQB1*03	25 (31,3%)	102 (38,9%)	0,2357
DQB1*04	4 (5%)	16 (6,1%)	1
DQB1*05	15 (18,8%)	42 (16%)	0.6077
DQB1*06	23 (28,8%)	56 (21,4%)	0,1754
Total	80	262	

Associações estatisticamente significantes estão apresentadas em negrito.

CAPÍTULO III

CONCLUSÃO

O estudo realizado para identificação dos genes de resposta imune em pacientes portadores de Hemofilia A provenientes do Estado do Paraná, mostrou que:

- 1) A identificação dos genes HLA pode ser muito importante no reconhecimento de grupos de alto risco para o possível desenvolvimento de inibidores nas diferentes populações. Em pacientes do Estado do Paraná, os alelos HLA-A*03, -B*42, -C*16 e -DRB1*14 foram associados positivamente à formação dos inibidores.
- 2) Embora outros fatores não genéticos tenham grande impacto no risco de desenvolvimento de inibidores, a obtenção desses dados é um grande limitante para que se consiga chegar a essas afirmações. O sistema de cadastro dos pacientes hemofílicos no Brasil mostrou-se um tanto falho quanto ao armazenamento de informações a respeito dos seus pacientes. No sistema não é possível colocar a data e nem todos os resultados de inibidores quantificados, considerando então o paciente com inibidor apenas pelo seu último resultado de exame, dependendo sempre da equipe para que faça a atualização, de modo que informações importantes não sejam notificadas. Também não é possível identificar parentescos pelo sistema.
- 3) Muitos pacientes apresentaram a presença de anticorpos anti-HCV em suas sorologias, assim como o HIV associado; contudo, essas associações não influenciaram no desenvolvimento de inibidores desses pacientes.
- 4) Há ainda um longo caminho a percorrer na identificação determinante para o desenvolvimento de inibidores. É de grande importância lembrar que, pacientes com hemofilias complicadas pela presença de inibidor sofrem constantemente riscos de terem hemorragias graves com efeitos prejudiciais em potencial sobre a sua qualidade de vida.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Frente aos resultados obtidos e de acordo com vários estudos apresentados, torna-se importante avaliar outros genes de resposta imune, como os polimorfismos de genes de citocinas, além de, entre os aspectos genéticos, identificar possíveis mutações no gene do fator VIII. O conjunto dessas informações levaria a um maior conhecimento dos mecanismos envolvidos na produção de inibidores por alguns indivíduos e não por outros.

Como o Brasil é um país que tem grande miscigenação entre a população, fica clara a necessidade de que estudos como esse sejam realizados em outros estados, para que se possa chegar a uma conclusão sobre os fatores de riscos associados ao desenvolvimento de inibidor em nossa população nacional. Isto também contribuiria para a solução de uns dos fatores limitantes de nossa pesquisa, que foi a necessidade de confirmação dos resultados com um número maior de pacientes hemofílicos, principalmente, daqueles produtores de inibidores.