

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**AVALIAÇÕES IMUNOGENÉTICAS DO  
DESENVOLVIMENTO DE ANTICORPOS INIBIDORES  
DO FATOR VIII NA HEMOFILIA A**

Daniel Gonçalves Chaves

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro  
Co-Orientadora: Dra. Cibele Velloso Rodrigues  
Co-Orientador: Dr. Olindo Assis Martins Filho

Belo Horizonte, abril de 2010

DANIEL GONÇALVES CHAVES

**AVALIAÇÕES IMUNOGENÉTICAS DO  
DESENVOLVIMENTO DE ANTICORPOS INIBIDORES  
DO FATOR VIII NA HEMOFILIA A**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro

Co-Orientadora: Dra. Cibele Velloso Rodrigues

Co-Orientador: Dr. Olindo Assis Martins Filho

Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2010

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais, à Fundação HEMOMINAS, à FAPEMIG, à CAPES-COFECUB e ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG pela oportunidade de realização do Doutorado em Imunologia.

Ao Professor Marcelo Matos Santoro pela orientação e confiança em meu trabalho.

À Dra. Cibele Velloso Rodrigues pelos anos de parceria profissional, mas principalmente pela confiança e amizade.

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho pelo aprendizado e pelas oportunidades oferecidas.

Ao Dr. Claude Granier por me receber em seu laboratório e proporcionar uma experiência única em minha formação.

Aos integrantes do Centro de Farmacologia e Biotecnologia para a Saúde - Faculdade de Farmácia da Universidade de Montpellier I pela importante parceria.

À Bia e demais servidores do Laboratório de Hematologia da Fundação Hemominas pela atenção dispensada durante o trabalho.

Aos amigos do Setor de Pesquisa da Fundação Hemominas, do Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas e do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração pela convivência enriquecedora.

Aos pacientes da Fundação Hemominas pela disponibilidade em participar desse trabalho.

À minha família pelo carinho e confiança constante.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Primeiro modelo da cascata de coagulação sangüínea.....	02
2	Organização Domínios e sítios de N-glicosilação na molécula de FVIII.....	05
3	Correlação entre o desenvolvimento de inibidores e o genótipo da hemofilia.....	08
4	Estrutura do domínio C2 do FVIII.....	12
5	Segmentos expostos e agrupamentos na superfície do domínio C2 do FVIII.....	28
6	Esquema de síntese de peptídeos pela estratégia Fmoc.....	29
7	Esquema de ligação de biomoléculas à resina <i>Thiopropyl Sepharose 6B</i> .....	31
8	Curva padrão de porcentagem de FVIII ativo em pool de plasmas de indivíduos sadios.....	41
9	Capacidade de neutralização de anticorpos anti-FVIII pelos peptídeos 92 e 93.....	43
10	Perfil de atividade bloqueadora dos peptídeos testados.....	44
11	Resultados de ELISA comparando a ligação de IgG total e frações de IgGs não retidas em cromatografia de afinidade ao FVIII.....	46
12	Perfil de citocinas de neutrófilos de indivíduos sadios, HA $\alpha$ -FVIII(-) e HA $\alpha$ -FVIII(+). .....	49
13	Perfil de citocinas de monócitos de indivíduos sadios, HA $\alpha$ -FVIII(-) e HA $\alpha$ -FVIII(+). .....	50
14	Perfil de citocinas de células T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> de indivíduos sadios, HA $\alpha$ -FVIII(-) e HA $\alpha$ -FVIII(+). .....	52
15	Porcentagem de células B TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> e IL-10 <sup>+</sup> de indivíduos sadios, HA $\alpha$ -FVIII(-) e HA $\alpha$ -FVIII(+). .....	53
16	Detecção por ELISA de anticorpos anti-FVIII IgG1 e IgG4 em amostras de plasma de pacientes HA $\alpha$ -FVIII(-) e HA $\alpha$ -FVIII(+). .....	54
17	Perfil de citocinas em cultura controle representado em diagrama de cores.....	55
18	Perfil de citocinas em culturas controle e estimuladas com FVIII (pdFVIII e rFVIII). .....	56
19	Frequência de produção de citocinas nos grupos BD, HA $\alpha$ -FVIII(-) e HA $\alpha$ -FVIII(+). .....	57
20	Perfil em espectrômetro de massa do peptídeo 89.....	95
21	Perfil em espectrômetro de massa do peptídeo 90.....	96
22	Perfil em espectrômetro de massa do peptídeo 91.....	97
23	Perfil em espectrômetro de massa do peptídeo 92.....	98
24	Perfil em espectrômetro de massa do peptídeo 93.....	99
25	Perfil em espectrômetro de massa do peptídeo 95.....	100
26	Perfil em espectrômetro de massa do peptídeo 96.....	101
27	Perfil em espectrômetro de massa do peptídeo 97.....	102
28	Perfil em espectrômetro de massa do peptídeo 98.....	103
29	Perfil em espectrômetro de massa do peptídeo 99.....	104

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
1	Conversão de atividade do FVIII residual a Unidades de Bethesda/mL.....	25
2	Seqüência dos peptídeos definidos como epitopos do FVIII.....	28
3	Condições adotadas nas PCRs para genotipagem dos polimorfismos em genes de citocinas (IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$ e IL-10).....	34
4	Título de Bethesda das amostras coletadas.....	40
5	Massas e padrão de ionização dos peptídeos definidos por espectrometria de massas.....	42
6	Resultados das análises de haplótipos do gene de IL-10.....	47
7	Genótipos da região promotora do gene IL-10 dos pacientes que não tiveram haplótipos definidos.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

Å	Angstrom
Acm	Acetamidometil
AgOTf	Triflato de prata
APCC	Concentrado de complexo protrombínico ativado
BD	Indivíduos sadios
BFA	Brefeldina A
BSA	Soro-albumina bovina
Cys	Cisteína
Da	Daltons
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FIX	Fator IX da coagulação sanguínea
FIXa	Fator IX da coagulação sanguínea ativado
FT	Fator tissular
FV	Fator V da coagulação sanguínea
FVII	Fator VII da coagulação sanguínea
FVIIa	Fator VII da coagulação sanguínea ativado
FVIII	Fator VIII da coagulação sanguínea
FVIIIa	Fator VIII da coagulação sanguínea ativado
FVIIIres	Fator VIII da coagulação sanguínea residual
FvW	Fator de von Willebrand
FX	Fator X da coagulação sanguínea
FXa	Fator X da coagulação sanguínea ativado
HA	Hemofilia A
HA $\alpha$ -FVIII(-)	Pacientes com hemofilia A sem inibidores de FVIII
HA $\alpha$ -FVIII(+)	Pacientes com hemofilia A e inibidores de FVIII
HLA	Antígeno leucocitário humano
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
kDa	Quilo Daltons
mRNA	RNA mensageiro
nm	Nanômetros
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato de sódio
PCC	Concentrado de complexo protrombínico

PCR-ASO	PCR alelo específica
pdFVIII	Fator VIII derivado de plasma
PMA	<i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
rFVIII	Fator VIII recombinante
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TFA	Ácido trifluoroacético
UB	Unidade de Bethesda
UI	Unidade Internacional

## RESUMO

Hemofilia A (HA) é uma coagulopatia com transmissão hereditária ligada ao cromossomo X decorrente da deficiência ou defeito no fator VIII da coagulação (FVIII). Indivíduos portadores dessa coagulopatia necessitam de infusões constantes de FVIII para manter sua hemostasia e sua integridade física. Durante o tratamento alguns pacientes desenvolvem uma resposta imune que produz anticorpos anti-FVIII. Esses anticorpos, também chamados inibidores, afetam a atividade pró-coagulante dessa proteína e diminuem a eficiência do tratamento, aumentando os custos desse e debilitando ainda mais o paciente. Apesar da relevância clínica dos inibidores de FVIII para o distúrbio da atividade hemostática dos pacientes com HA, os mecanismos imunológicos que levam à sua produção são desconhecidos.

Neste trabalho, foram desenhados e sintetizados dez peptídeos cujas seqüências estão em epitopos de superfície dos domínios a1 e C2 do FVIII. Todos os peptídeos foram capazes de bloquear anticorpos anti-FVIII do plasma de pacientes. Observou-se um perfil individual de reatividade com os peptídeos e esse perfil alterou-se ao longo do tempo. Três peptídeos foram ligados a uma resina e construiu-se uma cromatografia de afinidade com o objetivo de remover anticorpos anti-FVIII do plasma. As IgGs anti-FVIII foram significativamente capturadas pelas matrizes de afinidade peptídeo-Sepharose, o que foi confirmado por teste de ELISA.

Genotipagens de haplótipos da região promotora do gene da citocina IL-10 revelaram associações com a presença de inibidores de FVIII. A coexistência de um haplótipo GCC que define maior síntese de IL-10 e o haplótipo ACC que confere produção intermediária está associada com o grupo de pacientes que tem histórico de desenvolvimento de inibidores. Adicionalmente, a coexistência de haplótipos que definem maior e menor síntese de IL-10 está fortemente associada com a ausência de inibidores de FVIII no plasma.

Com o objetivo de caracterizar o padrão de citocinas dos leucócitos do sangue periférico dos pacientes com [HA $\alpha$ -FVIII(+)] e sem [HA $\alpha$ -FVIII(-)] inibidores de FVIII, amostras de sangue total foram estimuladas com pdFVIII ou rFVIII. Os resultados mostraram que

baixos níveis de neutrófilos  $\text{TNF-}\alpha^+$  com alto valor de razão  $\text{IL-5/TNF-}\alpha$  é característico do grupo  $\text{HA}\alpha\text{-FVIII}(+)$ . Embora todos os pacientes com HA apresentaram baixos níveis de monócitos  $\text{IL-10}^+$ , o grupo  $\text{HA}\alpha\text{-FVIII}(+)$  teve menores níveis de monócitos  $\text{TNF-}\alpha^+$ , levando a um aumento na razão  $\text{IL-10/TNF-}\alpha$  desse grupo. Análises da imunidade adaptativa revelaram que níveis aumentados de células T ( $\text{CD4}^+$  and  $\text{CD8}^+$ )  $\text{IFN-}\gamma^+$ ,  $\text{TNF-}\alpha^+$  e  $\text{IL-4}^+$  são seletivamente observados no grupo  $\text{HA}\alpha\text{-FVIII}(-)$ . Ademais, maiores freqüências de células B  $\text{IL-10}^+$  e maiores níveis de anticorpos IgG1 anti-FVIII foram observados no grupo  $\text{HA}\alpha\text{-FVIII}(-)$ , ao passo que níveis basais de células B citocinas<sup>+</sup> e maiores níveis de anticorpos IgG4 anti-FVIII foram encontrados no grupo  $\text{HA}\alpha\text{-FVIII}(+)$ . Adicionalmente, no perfil global de citocinas predomina um padrão anti-inflamatório/regulador no grupo  $\text{HA}\alpha\text{-FVIII}(+)$ , o que foi mantido após estímulo *in vitro* com pdFVIII ou rFVIII. A resposta imune polarizada anti-inflamatória/reguladora no grupo  $\text{HA}\alpha\text{-FVIII}(+)$  e pró-inflamatória modulada no grupo  $\text{HA}\alpha\text{-FVIII}(-)$  pode ser o elemento chave que controla o desenvolvimento de anticorpos inibidores de FVIII. Esses resultados podem ter implicações para o aprimoramento ou desenvolvimento de protocolos terapêuticos mais seguros e mais eficazes visando controlar ou impedir a síntese de inibidores em pacientes com HA.

## ABSTRACT

Hemophilia A (HA) is a coagulopathy with hereditary transmission linked to X-chromosome resulting in a deficiency or a defect in coagulation factor VIII (FVIII). Subjects with this coagulopathy need constant FVIII infusions to sustain their hemostasis and physical integrity. During the treatment some patients develop an immune response that produces anti-FVIII antibodies. These antibodies, also called inhibitors, affect the procoagulation activity of this protein and affect the treatment efficiency enhancing the costs and debilitate even further the patient. Despite the clinical relevance of factor VIII inhibitors to the impaired haemostatic activity of patients with HA, the exact immunological mechanisms underlying their production are still unknown.

In this work, we designed and synthesized ten peptides whose sequences are found in epitopes at the surface of A1 and C2 domains of FVIII. All peptides were able to block anti-FVIII Abs in plasma from patients. It was found an individual reactive profile to the peptides and this profile changed over the time. Three peptides were linked to a resin and an affinity chromatography assay was constructed to remove anti-FVIII Abs from plasma samples. Anti-FVIII IgGs were significantly captured by the peptide-Sepharose affinity matrixes as assessed by enzyme-linked immunosorbent assay.

Haplotypes genotyping at the promoter region of IL-10 gene revealed associations with the FVIII inhibitors presence. The coexistence of a haplotype GCC that define high IL-10 synthesis and the haplotype ACC that confers intermediate production is associated with the group of patients who have a history of inhibitor development. Additionally, the coexistence of haplotypes defining high and low IL-10 syntheses is strongly associated with the lack of FVIII inhibitors in the plasma.

Aiming to characterize the cytokine pattern in peripheral blood leukocytes from patients with [HA $\alpha$ -FVIII(+)] and without [HA $\alpha$ -FVIII(-)] anti-FVIII inhibitors, total blood samples were stimulated with pdFVIII or rFVIII. The results pointed out that decreased levels of TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> neutrophils with higher IL-5/TNF- $\alpha$  ratio is the hallmark of HA $\alpha$ -FVIII(+). Despite all HA patients displayed decreased levels of IL-10<sup>+</sup> monocytes,

HA $\alpha$ -FVIII(+) showed lower levels of TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> monocytes, leading to an increase in the IL-10/TNF- $\alpha$  ratio in this group. Analysis of adaptive immunity revealed that increased levels of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> and IL-4<sup>+</sup> T-cells, from both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells, are selectively observed in HA $\alpha$ -FVIII(-). Moreover, increased frequency of IL-10<sup>+</sup> B-cells and higher levels of  $\alpha$ -FVIII IgG1 were observed in HA $\alpha$ -FVIII(-), whereas basal levels of cytokine<sup>+</sup> B-cells and higher levels of  $\alpha$ -FVIII IgG4 are the major features of HA $\alpha$ -FVIII(+). Additionally, the global cytokine profile demonstrated a predominance of type-2 pattern in HA $\alpha$ -FVIII(+), further sustained after the *in vitro* stimuli with pdFVIII or rFVIII. The polarized type-2 immune response in HA $\alpha$ -FVIII(+) and the type-1 modulated in HA $\alpha$ -FVIII(-) may be the key element controlling the development of inhibitory anti-FVIII antibodies. These findings may have implications for the enhancement or design of more safe and effective therapeutic protocols to control or to block inhibitors synthesis in HA patients.

## SUMÁRIO

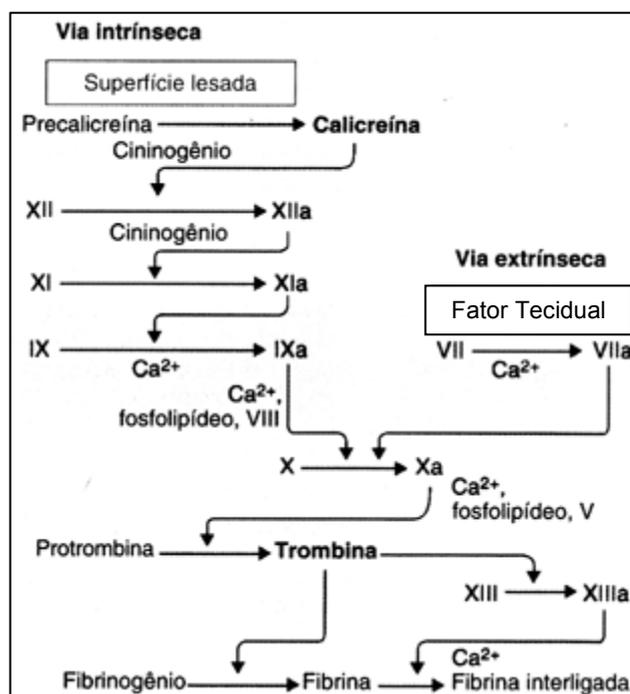
	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1. A coagulação sanguínea.....	02
1.2. O fator VIII.....	04
1.3. Hemofilia A.....	06
1.4. Anticorpos inibidores do FVIII na hemofilia A.....	06
1.5. Etiologia dos inibidores anti-FVIII.....	07
1.6. Imunobiologia dos inibidores anti-FVIII.....	10
1.7. Mecanismo de ação dos inibidores.....	11
1.8. Mapeamento de epitopos na molécula de FVIII.....	11
1.9. Imunogenética da produção de inibidores.....	13
1.10. Polimorfismos nos genes de citocinas.....	14
1.11. Tratamento na presença de inibidores anti-FVIII.....	16
1.12. Perspectivas terapêuticas na presença de inibidores.....	16
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
2.1. Objetivo geral.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
3.1. Aprovação da metodologia adotada.....	22
3.2. Equipamentos utilizados.....	22
3.3. Bloqueio e purificação de anticorpos anti-FVIII por peptídeos sintéticos..	23
3.3.1. Descrição das amostras.....	23
3.3.2. Quantificação dos inibidores.....	23
3.3.3. Predição de epitopos e desenho de peptídeos.....	26
3.3.4. Síntese de peptídeos solúveis.....	28
3.3.5. Titulação das amostras de plasma.....	30
3.3.6. Purificação de anticorpos.....	30
3.3.7. Remoção de grupamento Acm e ligação do peptídeo à resina <i>Thiopropyl-Sepharose 6B</i> .....	30
3.3.8. Purificação de anticorpos anti-FVIII.....	31
3.4. Polimorfismos em genes de citocinas.....	32
3.4.1. Descrição das amostras.....	32
3.4.2. Extração e quantificação de DNA.....	32
3.4.3. Amplificação e análise dos polimorfismos em genes de citocinas.....	33
3.4.4. Análises estatísticas.....	35
3.5. Imunofenotipagem de leucócitos e produção diferencial de citocinas.....	35
3.5.1. Descrição das amostras.....	35
3.5.2. Cultura de sangue total <i>in vitro</i> de curta duração.....	35
3.5.3. Imunofenotipagem de subtipos celulares e citocinas intracelulares...	36
3.5.4. Aquisição em citômetro de fluxo e análises.....	36
3.5.5. Reatividade de IgG1 e IgG4 anti-FVIII.....	37
3.5.6. Análises estatísticas.....	38
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>

4.1. Bloqueio e purificação de anticorpos anti-FVIII por peptídeos sintéticos..	40
4.1.1. Quantificação de inibidores de FVIII.....	40
4.1.2. Integridade dos peptídeos sintéticos.....	42
4.1.3. Bloqueio e purificação de anticorpos anti-FVIII por peptídeos sintéticos.....	42
4.2. Polimorfismos em genes de citocinas.....	47
4.3. Imunofenotipagem de leucócitos e produção diferencial de citocinas.....	48
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>69</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>94</b>

# **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1. COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA

Em 1863, Joseph Lister mostrou que o sangue permanecia fluido na veia jugular retirada de um boi, mas que ele rapidamente coagulava quando era transferido a um jarro de vidro. Essa superfície não fisiológica ativava uma seqüência de reações que se tornou conhecida como “via intrínseca da coagulação”. A coagulação pode ser também iniciada por substâncias que são liberadas dos tecidos, como consequência do seu trauma, gerando a via extrínseca da coagulação. Como proposto na década de 1960 pelo primeiro modelo da cascata de coagulação, um coágulo de fibrina é formado pela interação das duas vias. A via intrínseca começa com a ativação da calicreína, pelo contato com superfícies anormais produzidas pela lesão. A via extrínseca é disparada pelo trauma, que ativa o fator VII (FVII). Uma característica notável desse processo é que a forma ativada de um fator de coagulação catalisa a ativação do fator seguinte (Figura 1).



**Figura 1:** Primeiro modelo da cascata de coagulação sanguínea. ([www.geocities.com/bioquimicaplicada/Coagul6.gif](http://www.geocities.com/bioquimicaplicada/Coagul6.gif) - Modificado)

A coagulação sanguínea é um processo extremamente importante para a manutenção da hemostase de um sistema vivo quando ocorre alguma lesão de um tecido ou órgão. Esse

processo é desencadeado por proteínas plasmáticas, fatores de coagulação, que são secretados principalmente pelos hepatócitos na forma de zimogênios na corrente sanguínea (HU et al., 2003). Uma dessas proteínas, o fator VIII (FVIII) é um cofator na geração de trombina pelo complexo tenase (FVIII – FIX – FX) na superfície de plaquetas ativadas. Coágulos sanguíneos são formados por uma série de ativações desses zimogênios. Nessa cascata enzimática, a forma ativada de um fator de coagulação catalisa a ativação do próximo. Quantidades muito pequenas dos fatores iniciais são suficientes para disparar a cascata, por causa da natureza catalítica do processo de ativação. As numerosas etapas geram uma grande amplificação, assegurando uma rápida resposta ao trauma, controlando assim um sangramento que poderia comprometer o sistema como um todo.

Atualmente, tem sido amplamente aceito o modelo de cascata de coagulação, proposto por Hoffman (2003). O novo conceito, “modelo celular”, mostra que as vias extrínseca e intrínseca não atuam separadamente como no modelo de 1960, mas sim como complementos de uma única reação. As alterações propostas pelo modelo atual são respaldadas na principal falha do modelo anterior: não explicar por que os indivíduos com coagulopatias que apresentam apenas uma das vias afetadas, extrínseca ou intrínseca, não conseguem ter uma coagulação normal compensada pela via não afetada. Assim, o modelo celular de Hoffman propõe que os fatores pró-coagulantes ativados devem ser mantidos no local da lesão para promover um controle eficaz sobre o processo. Esse controle, por sua vez, seria feito pela superfície celular, principalmente de células endoteliais e plaquetas.

Para uma melhor compreensão do modelo atual, Hoffman divide o processo de coagulação sanguínea em três fases principais: inicial, amplificação e propagação. Na primeira, é proposto que o processo é iniciado no local da injúria por células que expressam Fator Tissular ( $FT^+$ ) e que estão fora do sistema circulatório. Na sua superfície, FVII ativado (FVIIa) complexado com  $FT^+$  ativa os fatores IX e X. O FX, por sua vez, se associa ao fator V formando o complexo de protrombinase na superfície celular. Em contrapartida, o FIX ativado (FIXa) se liga à superfície de plaquetas. Nessa fase inicial ocorre pequena formação de trombina e a coagulação passa para a fase de amplificação somente quando a lesão possibilita que plaquetas, fator VIII (FVIII) e fator de von Willebrand (FvW) passem para o meio extravascular e se liguem às células  $FT^+$ .

Na fase de amplificação, a pequena formação de trombina ocorrida na fase inicial ativa plaquetas, expondo receptores e sítios de ligação a fatores ativados. Além disso, há ativação de fatores VIII, XI e V. Nesse estágio, a liberação do FvW, antes complexado com o FVIII, possibilita maior adesão e agregação plaquetária promovidas por essa molécula. Na última fase, de propagação, vários eventos ocorrem na superfície das plaquetas: ligação do FIX ao FVIII, dissociação do FX antes ligado ao FV e formação do complexo tenase (FVIII/FIX/FX). Nesse momento ocorre grande formação de trombina, o que possibilita a formação do coágulo de fibrina.

Nesse contexto, pode-se perceber a importância dos diversos fatores de coagulação e mensurar os problemas causados pela ausência de apenas um deles. A falta de algum fator no organismo é causa de diversas coagulopatias. Entre as mais conhecidas podemos destacar a hemofilia B causada por deficiência de FIX, a deficiência de FvW, causa da doença de von Willebrand, de FVII, de FV e a hemofilia A, mais prevalente e foco desse trabalho, causada pela deficiência quantitativa ou funcional do FVIII.

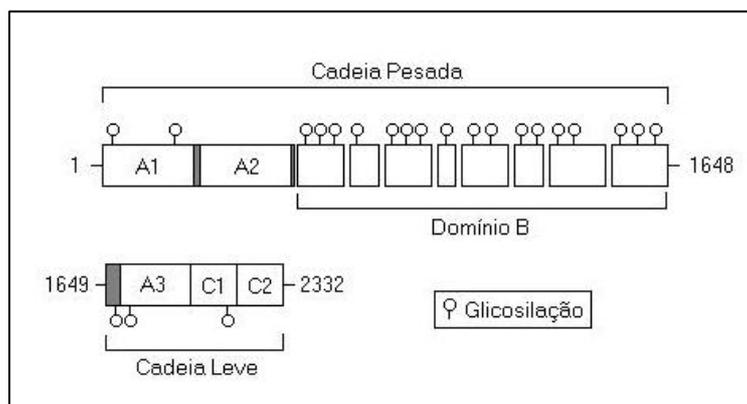
## **1.2. O FATOR VIII**

O FVIII é codificado pelo gene F8 de 186Kb e 26 *exons* no cromossomo Xq28 cuja expressão se dá principalmente no fígado. O seu transcrito é de aproximadamente 9Kb com 7053 nucleotídeos traduzido como um precursor protéico de 2351 aminoácidos, com cerca de 330 kDa, que subsequenteiramente passa por um processamento proteolítico (GITSCHIER et al., 1984; WOOD et al., 1984; TOOLE et al., 1984; LEVINSON et al., 1992). A proteína madura contém 2332 aminoácidos e seu peso molecular estimado é de 265 kDa. O FVIII é altamente glicosilado e possui 25 sítios possíveis de asparagina para formar N-glicosilação (VEHAR et al., 1984; LENTING et al., 1998) (Figura 2).

O FVIII é constituído de vários domínios com homologia interna: os três primeiros domínios da porção N-terminal, A1 (1-329), A2 (380-711) e A3 (1649-2019) apresentam homologia na seqüência de aminoácidos de aproximadamente 30%. Os domínios A2 e A3 são separados pelo domínio B (740-1648). Na porção C-terminal da proteína madura há dois domínios homólogos: C1 (2020-2172) e C2 (2173-2332).

O domínio B ficou por muito tempo sem função conhecida (VEHAR et al., 1984; KANE & DAVIE, 1986). Alguns grupos de pesquisa têm mostrado com sucesso a participação do domínio B no *clearance* da molécula de FVIII através de receptores de asialoglicoproteínas (BOVENSCHEN et al., 2005) em uma ligação dependente de cálcio e sensitiva a D-galactose. Tal ligação se deve ao fato do domínio B possuir 19 dos 25 sítios de N-glicosilação da molécula (VEHAR et al., 1984; LENTING et al., 1998). Entretanto, parece que o *clearance* do FVIII não é totalmente determinado pela ligação aos receptores de asialoglicoproteínas (BOVENSCHEN et al., 2005). Esses receptores são abundantemente expressos no fígado e são membros da família tipo-C de lectinas que atuam como ligantes na endocitose de glicoproteínas da circulação (ASHWELL & HARFORD, 1982; STOCKERT, 1995).

O FVIII circula no plasma associado ao fator de von Willebrand (FvW) via domínio C2, na forma de heterodímero, constituído de uma cadeia pesada (domínios A1-A2 e uma região variável do domínio B) e de uma cadeia leve (domínios A3-C1-C2) associadas via interação de um íon metal. Esse heterodímero requer ativação proteolítica para produzir a forma do cofator ativa, FVIIIa. Como resultado de proteólise durante a cascata de coagulação sangüínea, ocorrem clivagens na cadeia leve e na cadeia pesada. A interação com FvW facilita essas clivagens e a ativação do FVIII pela trombina. Ambos, trombina e FXa ativam o FVIII sendo que o FXa tem 20% da eficiência catalítica da trombina (LOLLAR et al., 1985). Após ativação, o FVIII é liberado do FvW e se liga ao FIX ativado e a fosfolipídios de membrana para formar o complexo ativador do FX.



**Figura 2:** Organização de domínios e sítios de N-glicosilação na molécula de FVIII. (BOVENSCHEN et al., 2005. Modificado).

### **1.3. HEMOFILIA A**

Hemofilia A (HA) é um dos distúrbios hemorrágicos mais comuns com transmissão hereditária. O gene para o FVIII está localizado no cromossomo Xq28 e, conseqüentemente, a HA apresenta herança ligada ao X recessiva (HOYER, 1994). Essa coagulopatia resulta da deficiência ou do defeito do FVIII e pode apresentar-se sobre graus variáveis de deficiência resultando em tempo prolongado de coagulação sangüínea. A freqüência da hemofilia A é de 1-2 em 10.000 (0,01 – 0,02%) meninos nascidos vivos em todos os grupos étnicos (RIZZA & SPOONER, 1983; HOYER, 1987).

A gravidade e a freqüência de hemorragias nos pacientes hemofílicos estão relacionadas à atividade do FVIII no plasma. Aproximadamente 50% dos pacientes têm a forma grave da doença com atividade do FVIII menor que 1% do normal; eles apresentam freqüentes hemorragias espontâneas nas articulações, nos músculos e órgãos internos. A forma moderada da HA, caracterizada por atividade de FVIII de 2-5% do normal, ocorre em cerca de 10% dos pacientes, apresentando quadros hemorrágicos após pequenos traumas. A forma leve, a qual ocorre em 30-40% dos pacientes, está associada com atividade do FVIII de 5-30% e ocorrem hemorragias somente após traumas significativos ou cirurgias. Há ainda uma categoria de pacientes (cerca de 5%) que tem ao menos 30% da quantidade normal do FVIII, mas esse não apresenta atividade funcional, ou seja, a atividade do FVIII é muito menor que o nível plasmático de proteína (ANTONARAKIS et al., 1995). O tratamento adequado dessa doença requer infusões de concentrados do FVIII purificado de plasma humano ou FVIII recombinante.

### **1.4. ANTICORPOS INIBIDORES DO FVIII NA HEMOFILIA A**

Aproximadamente 25% dos pacientes com HA grave (atividade de FVIII < 1%) e 15% dos pacientes com HA moderada ou leve (BAYRY et al., 2003) podem desenvolver anticorpos inibidores ao longo do tratamento de reposição protéica. De uma forma geral, 10-40% dos pacientes hemofílicos apresentam inibidores capazes de inativar o FVIII (EHRENFORTH et al., 1992). Esses inibidores ou aloanticorpos, provenientes da resposta imune, geram principalmente imunoglobulinas IgG4. A presença desses

anticorpos inibidores aumenta a dificuldade no tratamento da doença, pois interfere diretamente na atividade pró-coagulante do FVIII infundido. Adicionalmente, ocorre considerável aumento nos custos de tratamento desses pacientes.

Embora o paciente com inibidor do FVIII possa não manifestar sintomas clínicos evidentes, esse pode ser detectado durante a análise clínica rotineira. Também pode se suspeitar da presença de inibidores quando o quadro hemorrágico não é controlado tão rapidamente como poderia se esperar em resposta ao tratamento. A presença do inibidor é geralmente confirmada usando um teste de coagulação sanguínea (Teste de Bethesda) (VERBRUGGEN et al., 1995, 2002). Uma unidade de Bethesda (UB) representa o inverso da diluição do plasma que neutraliza 50% de FVIII no plasma normal (LAVIGNE-LISSALDE et al., 2005) e resultados acima de 5UB/mL são considerados altos níveis de inibidor.

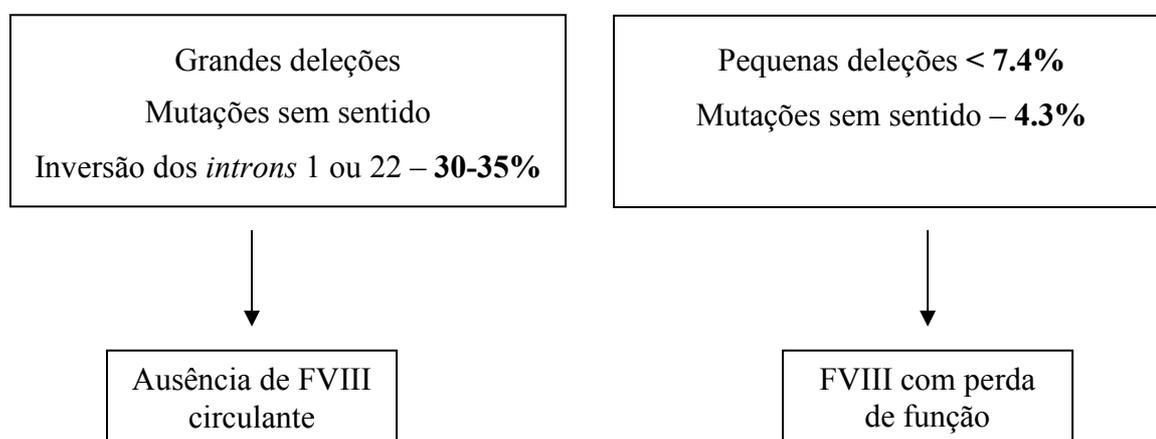
Os altos títulos de inibidores podem se manter por vários meses mesmo se o paciente interromper a exposição ao FVIII, caracterizando um quadro de inibidor de alta resposta. Alternativamente, o sistema imune pode ser estimulado de modo que a resposta à exposição ao fator seja menor e mais fraca e as unidades Bethesda permanecem baixas, caracterizando um quadro de inibidor de baixa resposta. Os títulos de inibidores podem se alterar ao longo do tempo e às vezes observa-se seu desaparecimento espontâneo dentro de semanas ou meses sem tratamento aparente (DIMICHELE, 2000).

## **1.5. ETIOLOGIA DOS INIBIDORES ANTI-FVIII**

Pouco se conhece sobre a etiologia do desenvolvimento dos inibidores de FVIII o que dificulta o tratamento ou minimização da resposta imune. Entretanto, existe a suspeita da interação entre predisposição genética e condições ambientais ou exógenas. As condições pré-existentes as quais parecem influenciar o desenvolvimento de anticorpos incluem: o tipo e a gravidade da hemofilia, a etnia do paciente (indivíduos de herança afro-americana), o genótipo da hemofilia e o imunofenótipo (DIMICHELE, 2002). Reforçando a idéia de interação genética e ambiental, pacientes da mesma família, com a mesma mutação no gene do FVIII, apresentam desenvolvimento diferenciado de inibidores. A incidência de inibidores é mais alta entre aqueles com hemofilia grave ou

moderada e o desenvolvimento de inibidor não é comum entre pessoas com hemofilia cujo nível de FVIII é maior que 5%. Os inibidores aparecem nos primeiros meses de tratamento, geralmente entre a primeira e a quinta infusão de FVIII (EHRENFORTH et al., 1992).

Estudos de correlação entre o genótipo da hemofilia A e a formação de inibidores determinam que certos genótipos (inversão do *intron 22*, grandes deleções e mutações sem sentido) foram significativos entre os pacientes que desenvolvem inibidores. Ao contrário, mutações de sentido trocado e pequenas deleções estavam sub-representadas nesse grupo (SCHWAAB et al., 1995). Um esquema mostrando a correlação entre o desenvolvimento de inibidores e o genótipo da hemofilia é mostrado na figura 3.



**Figura 3:** Esquema da correlação entre o desenvolvimento de inibidores e o genótipo da hemofilia. Em negrito são mostradas as taxas de aparecimento de inibidores em cada grupo (OLDENBURG et al., 2006. Modificado).

Além dos fatores genéticos envolvendo diretamente o gene do FVIII, estudos mostram que alguns haplótipos de HLA têm predisposição para apresentação de peptídeos da molécula de FVIII e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de inibidores (HAY et al., 1997; OLDENBURG et al., 2000).

Entre os fatores de risco não genéticos, o mais controverso é o papel do tipo de produto usado no tratamento da hemofilia. Especificamente, são bastante debatidos os riscos relativos do FVIII recombinante ou derivado do plasma para induzir a formação dos anticorpos (DIMICHELE, 2002). Alguns estudos mostram que não existem associações entre o desenvolvimento de inibidores e o tipo de FVIII utilizado no tratamento, seja

recombinante ou derivado do plasma (HOYER, 1995). Existe a suspeita de que diferentes passos na purificação da proteína e a inativação viral possam causar modificações nas propriedades físico-químicas da molécula de FVIII aumentando a sua imunogenicidade. Reforçando essa hipótese, ocorreram alguns casos de desenvolvimento de inibidores em pacientes tratados com um determinado concentrado de FVIII que havia sido submetido a um novo processo de pasteurização na Alemanha, Holanda e Bélgica (PEERLINCK et al., 1993, 1997; ROSENDAAL et al., 1993). Curiosamente, esses inibidores eram específicos para o domínio C2, sugerindo uma modificação conformacional desse domínio durante o processo de pasteurização (SAWAMOTO et al., 1998; BARROW et al., 2001). Além desses fatores, parece que a ausência ou baixa concentração de FvW no manufaturamento do concentrado de FVIII pode permitir uma alteração conformacional da molécula e torná-la mais imunogênica. Essas observações foram feitas em estudos com camundongos nocaute para o gene de FVIII (BEHRMANN et al., 2002).

Estudo recente verificou que pacientes negros portadores de HA têm duas vezes mais chance de desenvolver inibidores quando comparados aos indivíduos caucasianos (VIEL et al., 2009). Acredita-se que alguns haplótipos do gene de FVIII mais encontrados na população negra codifiquem uma proteína diferente da utilizada no tratamento de reposição protéica. Dessa forma, acredita-se que diferenças entre o FVIII infundido e o FVIII sintetizado pelo paciente possam contribuir para uma alta incidência de inibidores de FVIII em pacientes negros.

Outras situações parecem influenciar o desenvolvimento de inibidores: os locais mais comuns de ocorrência de hemorragias, a coexistência de inflamação, a intensidade de reposição do fator e o estado nutricional do paciente (DIMICHELE, 2002). O risco de desenvolvimento de inibidores também aumenta com o início precoce de terapia com FVIII.

Em raros casos, os inibidores do FVIII surgem como autoanticorpos em hemofilias não congênitas, mas adquiridas. Os autoanticorpos podem surgir espontaneamente em associação com várias doenças autoimunes e doenças crônicas inflamatórias, neoplasias hematológicas, tumores sólidos, uso de certas drogas, condições dermatológicas e pós-parto. A maioria dos casos é caracterizada por hemorragias graves e pode surgir em

ambos os sexos (LACROIX-DESMAZES et al., 2002a), acometendo um indivíduo entre 1.000.000 de pessoas por ano (LAVIGNE-LISSALDE et al., 2005).

## **1.6. IMUNOBIOLOGIA DOS INIBIDORES ANTI-FVIII**

Os inibidores do FVIII são anticorpos policlonais, principalmente da subclasse de imunoglobulinas IgG4 produzidos por linfócitos B estimulados por células T CD4<sup>+</sup> específicas para o FVIII (REDING et al., 2003), caracterizando uma resposta do tipo Th2 (PUNNONEN et al., 1993). As causas que levam a essa prevalência de IgG4 ainda são desconhecidas. Gilles et al. (1993) purificaram aloanticorpos utilizando uma coluna de afinidade e observaram que os anticorpos anti-FVIII seguem um padrão fisiológico de subclasses de IgG. Entretanto, outros estudos demonstram a prevalência da subclasse IgG4 combinada com outras subclasses, principalmente IgG1 (SHAPIRO, 1967; FULCHER et al., 1987; ALGIMAN et al., 1992). Alguns isotipos como IgM e IgA também são observados em pacientes com hemofilia adquirida (KESSLER, 2000).

Essa resposta imune ao FVIII é policlonal (GILLES et al., 1993). Tais anticorpos anti-FVIII neutralizam a atividade procoagulante do FVIII no plasma através do bloqueio funcional da proteína. Embora o mecanismo de desenvolvimento dos inibidores seja incompletamente entendido, considera-se que a ocorrência desses reflita uma resposta imune alogênica à administração repetida da proteína exógena.

## **1.7. MECANISMO DE AÇÃO DOS INIBIDORES**

Para compreender a ação dos inibidores de FVIII, são propostos muitos mecanismos pelos quais eles interferem com a atividade pró-coagulante da proteína:

- Alguns anticorpos se ligam ao domínio A2 do FVIII, resultando em impedimento estérico do sítio de clivagem da trombina localizado entre os domínios A1 e A2 (FOSTER et al., 1988; LUBAHN et al., 1989).
- Anticorpos direcionados contra o domínio C2 da cadeia leve inibem a ligação do FVIII aos fosfolipídios de membrana (ARAI et al., 1989; SHIMA et al., 1993).

- Anticorpos direcionados contra os domínios A3 e/ou C2 da molécula podem impedir a estabilização da interação do FVIII com o FvW e interferir com sua ligação ao FIXa via cadeia leve (SAENKO et al., 1994; ZHONG et al., 1998).
- Inibidores do FVIII podem se ligar aos epítopos formados pela associação do FVIII e FvW e impedir sua liberação quando clivado pela trombina (SAENKO et al., 1996; GILLES et al., 1999).

Foi também relatado que alguns inibidores do FVIII inibem a atividade pró-coagulante desse fator por degradação proteolítica (LACROIX-DESMAZES et al., 2002, 2006).

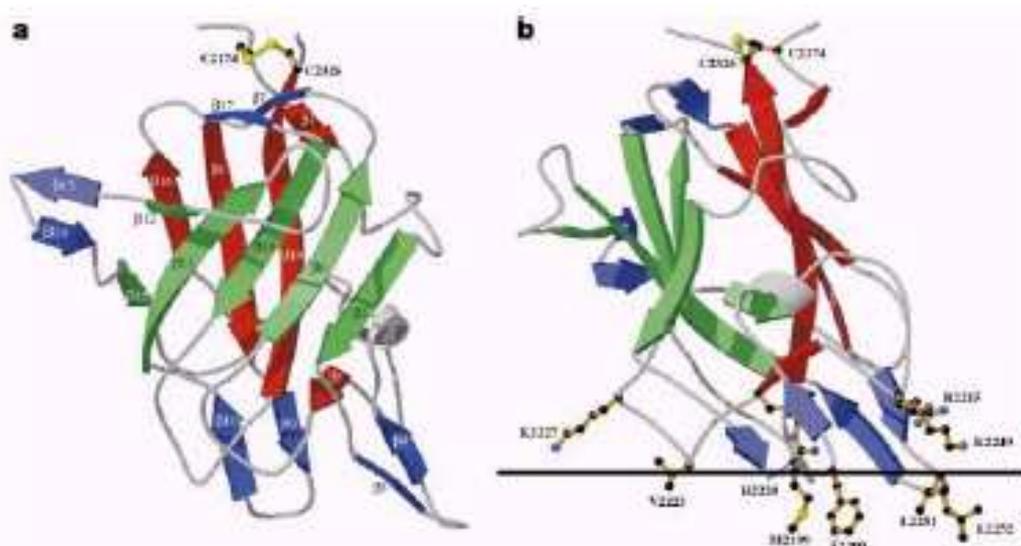
### **1.8. MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS NA MOLÉCULA DE FVIII**

Os primeiros estudos de mapeamento de epítopos começaram há aproximadamente 25 anos (FULCHER et al., 1985). Esses estudos mostraram que a maioria dos epítopos reconhecidos pelos inibidores está localizada na cadeia leve da molécula de FVIII, em um fragmento de 44 kDa correspondente ao domínio A2 e em um fragmento de 54 kDa correspondente ao domínio A1 (FULCHER et al., 1987). O mapeamento de epítopos da molécula de FVIII reconhecidos pelos anticorpos inibidores revelou que o padrão de reatividade do anticorpo é realmente policlonal, direcionado contra múltiplos locais situados no FVIII e único para cada inibidor do plasma investigado (DIMICHELE, 2000). Além disso, os estudos mostraram que os inibidores reconhecem sítios de ligação restritos, predominantemente, nos domínios A2, A3 e C2 da molécula de FVIII.

A maioria dos inibidores que reconhecem a cadeia leve do FVIII se liga ao domínio C2 (SHIMA et al., 1993; SCANDELLA et al., 1995; HEALEY et al., 1998; JACQUEMIN et al., 1998), que possui dois sítios de reconhecimento de anticorpos bem caracterizados. Esses anticorpos impedem a ligação do FVIII ao FvW e aos fosfolípidios de membrana e, conseqüentemente, o complexo tenase não é formado (FIJNVANDRAAT et al., 2003).

O domínio C2 (Figura 4) possui 21 resíduos de aminoácidos que são conhecidos sítios de deleções pontuais responsáveis pela inativação do FVIII (PRATT et al., 1999). Além de mutações pontuais, as mutações sem sentido no domínio C2 aumentam em quatro vezes a chance de desenvolvimento de inibidores (OLDENBURG et al., 2002). Tal fato

sugere que esse domínio em particular seja mais imunogênico que os demais, principalmente por possuir grandes alças expostas na superfície da molécula (PRATT et al., 1999; SCANDELLA et al., 2001). Entretanto, alguns trabalhos evidenciam a predominância de epítopos preferenciais nos outros domínios do FVIII (SCANDELLA et al., 2001; KOPECKY et al., 2006).



**Figura 4:** Estrutura do domínio C2 do FVIII. (a) estrutura do domínio C2 quando o FVIII está solúvel no plasma. O domínio é composto de 19 folhas- $\beta$ . (b) estrutura do domínio C2 ligado a fosfolipídeos de membrana. (PRATT et al., 1999).

## 1.9. IMUNOGENÉTICA DA PRODUÇÃO DE INIBIDORES

A resposta imune humoral requer células apresentadoras de antígeno nas quais peptídeos de antígenos específicos são apresentados na superfície de moléculas HLA classe II aos receptores de células T. *Locus* do HLA são altamente polimórficos. Por isto, a formação de anticorpos inibidores em pacientes portadores de HA poderia estar associada aos locos de HLA. No entanto, estudos indicam que a resposta imune desses pacientes é fracamente associada aos polimorfismos de antígenos de histocompatibilidade (NUNEZ-ROLDAN et al., 1979; MAYR et al., 1984; SIMONNEY et al., 1985; PAPASTERIADES et al., 1986; ALY et al., 1990; LIPPERT et al., 1990; HAY et al., 1997; OLDENBURG et al., 1997; TUDDENHAM & MCVEY, 1998).

Na maioria dos estudos os dados foram inconclusivos e outros autores sustentam que é fraca a associação de genótipos HLA com produção de inibidores em pacientes com mutações idênticas no gene do FVIII (TUDDENHAM & MCVEY, 1998). Tizzano et al. (2002) relataram que, embora o perfil de HLA classe II possa constituir um fator de risco fraco, seus estudos mostraram que a associação entre HLA e a formação de inibidores de FVIII é diferente entre grupos étnicos. Juntos, os estudos mostram que a associação entre HLA e a formação de inibidor do FVIII em pacientes HA difere entre grupos étnicos. Tais dados podem ser úteis no reconhecimento de grupos de alto risco para a possível formação de inibidores nas diferentes populações.

Portanto, além das mutações dentro do gene do FVIII, os genes envolvidos na resposta imune são candidatos moleculares como determinantes imunogenéticos na predisposição para o desenvolvimento de inibidores. Tais genes candidatos seriam os das classes de HLA e de citocinas (OLDENBURG et al., 2002). Tizzano et al. (2002) sugerem que o estudo de fatores genéticos relacionados à resposta imune, subpopulações de linfócitos (Th1 e Th2) e a caracterização de suas citocinas são linhas de pesquisa relevantes nos pacientes que produzem esses anticorpos anti-FVIII.

Citocinas pertencem a uma grande família de pequenas proteínas secretadas principalmente por leucócitos e apresentam um papel essencial na mediação da função imune. Muitas citocinas têm fontes e alvos celulares múltiplos, assim como agem muitos indutores e inibidores naturais. Essas características, além das funções particulares das citocinas (modo de ação autócrino e parácrino, atividades sobrepostas, ação pleiotrópica, funcionando como uma rede reguladora complexa e regulação recíproca dos grupos Th1 e Th2) fundamentam o provável papel das citocinas em doenças decorrentes da ação do sistema imune.

O uso da citometria de fluxo para análise de marcadores de superfície celular específicos de células T (CD3 e CD4), juntamente com a produção de citocinas intracelulares, foi utilizada para identificar a frequência e a cinética de diferentes populações de células T CD4<sup>+</sup> específicas para o FVIII em modelo animal (camundongos hemofílicos E-17) após tratamento com FVIII humano. Células T CD4<sup>+</sup> específicas para o FVIII, secretoras de INF- $\gamma$  e IL-2, têm sido identificadas, caracterizando uma forte resposta Th1 em camundongos (REIPERT et al., 2001).

Células T CD4<sup>+</sup> FVIII-específicas, positivas para IL-10, também estão presentes. As células T secretoras de INF- $\gamma$  foram os tipos mais proeminentes, sugerindo que células T tipo Th1 têm um papel importante na regulação da resposta imune em camundongos hemofílicos E-17. As células T produtoras de IL-10 foram o segundo tipo mais dominante. Elas foram detectadas após duas doses de FVIII e o aumento na frequência dessas células ocorreu após a quarta dose. Estudos de co-expressão mostraram que devem ocorrer dois tipos de células T positivas para IL-10: aquelas que produzem somente IL-10 e outras que produzem INF- $\gamma$  e IL-10. Além disto, células T produzindo IL-2 foram encontradas em todos os experimentos após duas doses de FVIII. Em poucos experimentos foram vistas células T produtoras de IL-4 (SASGARY et al., 2002).

### **1.10. POLIMORFISMOS NOS GENES DE CITOCINAS**

O perfil de produção de citocinas tem uma predisposição genética, a qual pode contribuir com as diferenças interindividuais na resposta imune (AWAD et al., 2001; BATHGATE et al., 2000; AZIZ et al., 2000). Estudos mostraram que polimorfismos na região regulatória e intrônica de várias citocinas estão associados com a produção diferencial de citocinas (WILSON et al., 1992; TURNER et al., 1997; FISHMAN et al., 1998; PRAVICA et al., 1999) e que certos polimorfismos estão associados a doenças (BIDWELL et al., 1999). Polimorfismos na região promotora podem influenciar a ligação de fatores de transcrição, aumentando ou diminuindo a produção de mRNA e, então, regulando a produção da citocina. Muitos polimorfismos nas regiões reguladoras de genes de citocinas foram identificados e correlacionados com a produção destas (HUTCHINSON et al., 1998a, 1998b, 1999; SANKARAN et al., 1999).

Algumas citocinas possuem múltiplos polimorfismos, embora nem todos estejam associados com alterações reais na sua produção. Investigações prévias têm demonstrado a associação entre polimorfismos genéticos de citocinas e a patogênese de diversas doenças, incluindo infecção (NADEL et al., 1996; LIU et al., 1999), alergias (HOBBS et al., 1998; MOFFATT et al., 1997) e doenças autoimunes (LAZARUS et al., 1997; ROOD et al. 2000; ESKDALE et al., 1997; FISHMAN et al., 1998).

A produção diferencial na síntese de citocinas pode estar ligada a polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) nas seqüências promotoras e sinalizadoras e nos *introns* dos genes. Polimorfismos em um número razoável de genes de citocinas humanas foram correlacionados a diferentes níveis de produção da proteína (AWADD, et al. 2001; TURNER et al., 1997), rejeição de transplantes (TURNER, 1997), fibrose (AWADD, et al. 2001) e autoimunidade (LAZARUS et al., 1997). Microsatélites são usados como marcadores e repetições de dinucleotídeos polimórficas ocorrem dentro de genes de muitas citocinas humanas.

Interleucina-10 (IL-10) é uma importante citocina pleiotrópica com funções anti-inflamatória e estimulatória de linfócitos B. A expressão de IL-10 é altamente controlada. A região promotora do gene dessa citocina (Gen Bank U16720) apresenta diferentes polimorfismos (IL-10 -1082 G/A, -819 T/C, -592 A/C) associados com baixa ou alta produção da citocina. A produção de IL-10 está associada a 3 haplótipos: (GCC/ATA/ ACC). Especificamente, o alelo -1082G está associado à maior produção de IL-10, enquanto o alelo -1082A está associado com baixos níveis de IL-10. Então, o haplótipo GCC/GCC está associado com maior produção de IL-10, enquanto GCC/ATA e GCC/ACC estão associados com produção intermediária e ATA/ATA, ATA/ACC, e ACC/ACC com baixa produção (JULIE et al., 2005). Astermark et al. (2006a) identificaram correlação positiva de um microsatélite CA na região promotora do gene da IL-10 (alelo 134) com o aumento da produção de inibidores anti-FVIII em pacientes com HA grave. Mais recentemente, o polimorfismo TNF- $\alpha$  (-308) genótipo A/A foi associado ao grupo de pacientes que desenvolvem inibidores anti-FVIII com hemofilia grave e com mutação de inversão no gene do FVIII (ASTERMARK et al., 2006b).

### **1.11. TRATAMENTO NA PRESENÇA DE INIBIDORES ANTI-FVIII**

Constitui um desafio terapêutico tratar pacientes hemofílicos que apresentam inibidores em episódios de hemorragia. Algumas alternativas terapêuticas foram desenvolvidas para diminuir as complicações que surgem da presença desses inibidores. O uso de concentrado de complexo protrombínico (PCCs) ou concentrado de complexos protrombínicos ativados (APCCs) podem estimular a formação de um coágulo e parar a hemorragia e superar o requerimento de FVIII. No entanto, esse tipo de terapia apresenta limitações, pois freqüentemente pode causar excesso de coagulação. Além

disso, esses produtos contêm pequenas quantidades de FVIII e maiores quantidades de FIX, podendo também estimular nova produção de anticorpos tanto para o FVIII quanto para o FIX. Finalmente, esses concentrados podem constituir riscos de contaminação viral para o paciente. Alternativamente, a administração de FVII ativado humano recombinante é outra opção na terapia para pacientes com inibidor. Esse produto tem ação curta e múltiplas doses (a cada 2-4 horas) são necessárias para parar a hemorragia.

Alguns tratamentos têm como objetivo induzir a tolerância imune com infusões regulares do FVIII por um período de semanas a anos com ou sem imunossupressão farmacológica, mas consome tempo e é de alto custo (DIMICHELE, 2000). A redução da concentração de inibidores por plasmaférese tem sido uma tentativa prévia à administração de FVIII na fase aguda da doença (BRAUN E BOSCH, 2000), mas esse método não tem recebido aprovação geral devido às limitações na quantidade de plasma que pode ser filtrado sem a perda de proteínas essenciais.

### **1.12. PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS NA PRESENÇA DE INIBIDORES**

Embora haja muitas opções terapêuticas e esses tratamentos tenham realmente melhorado o manejo médico dessa doença, não foi ainda atingido o objetivo principal para a terapia: a neutralização específica da resposta imune ao FVIII. Portanto, mostra-se crucial a criação de uma solução terapêutica que inative ou extraia do plasma apenas os inibidores do FVIII. Para tal, várias propostas estão sendo feitas:

- Tratamento dos hemofílicos com moléculas de FVIII menos imunogênicas. Nesse sentido estão sendo realizados tratamentos com moléculas de FVIII porcinas (MORRISON et al., 1993). Alguns grupos de pesquisa desenvolveram moléculas híbridas humana/porcina de FVIII (LOLLAR, 1997) e estudos já demonstraram, *in vitro*, que a proteína híbrida é pouco reconhecida pelo sistema imune humano (BARROW et al., 2000). Adicionalmente, acredita-se que o uso de proteínas menos imunogênicas, modificadas por engenharia genética, pode representar um avanço considerável na prevenção dos inibidores de FVIII (VIEL et al., 2009).

- Reduzir o título de inibidores do FVIII bloqueando-os com peptídeos que mimetizem os epitopos da molécula original, considerando-se que os peptídeos não seriam reconhecidos pelo sistema imune devido ao seu tamanho reduzido (VILLARD et al., 2002; 2003).
- Agir diretamente na resposta imune, suprimindo células B anti-FVIII, o que poderia ser alcançado depletando essas células do sistema imune através de anticorpos anti-idiotípicos.

Experiências baseadas no bloqueio da atividade deletéria dos anticorpos por peptídeos de baixo peso molecular têm como objetivo restaurar a atividade procoagulante normal do FVIII por impedir a sua ligação aos anticorpos (VILLARD et al., 2002). Esses peptídeos foram construídos para mimetizar os epitopos dos anticorpos anti-FVIII, mas não possuem uma homologia de seqüência com o FVIII (GEYSEN et al., 1986).

Nesses testes foram identificados, por *phage display*, peptídeos mimotopos do domínio C2 que seriam capazes de neutralizar o anticorpo murino anti-FVIII ESH8 (SCANDELLA et al., 1995). Tais peptídeos vêm sendo utilizados em ensaios *in vitro* e *in vivo* e parecem ser potentes armas no bloqueio de inibidores do FVIII. Porém, essas cadeias polipeptídicas não são estáveis no plasma e sofrem ações de proteases. A estabilidade requerida pode ser alcançada incluindo ligações dissulfeto na cadeia, acetilação da região N-terminal e amidação da região C-terminal (TAMAMURA et al., 2001).

Além disso, testes utilizando peptídeos obtidos através da seqüência linear do FVIII têm sido realizados para se detectar a capacidade de neutralização de inibidores (PALMER et al., 1997, NOGAMI et al., 1999). Adicionalmente, os próprios inibidores têm sido ferramentas importantes para se determinar possíveis epitopos na superfície do FVIII (DI GIAMBATTISTA et al., 2001).

Outros grupos de pesquisa têm tentado retirar esses anticorpos do plasma por purificação em colunas de afinidade. Porém, os testes realizados não utilizam peptídeos correlatos ao FVIII, mas sim moléculas que possuem afinidade pelos inibidores: proteína A e anticorpos anti-IgG humana (KNOBL et al., 1999), proteínas pró-coagulantes e proteína C3 do complemento (BOISSON-VIDAL et al., 2002), grupos

sulfonato e L-tirosil metilester (HUGUET et al., 2004). Nesse contexto, a completa eliminação dos anticorpos inibidores não foi obtida e, em alguns casos, proteínas plasmáticas e imunoglobulinas essenciais foram removidas do plasma. Em contrapartida, pode-se esperar um papel significativo de peptídeos mimotopos do FVIII na redução dos títulos de anticorpos dos pacientes se aplicados na depuração dos inibidores através de plasmaférese, caracterizando uma eliminação específica e com conseqüências negativas menores ou até ausentes.

## **2. OBJETIVOS**

## **2.1. OBJETIVO GERAL**

Realizar estudos dos vários aspectos imunogenéticos associados à resposta imune de pacientes hemofílicos decorrentes do tratamento com fator VIII.

## **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Avaliar a capacidade de depuração de anticorpos anti-FVIII por peptídeos que mimetizam epitopos da molécula de FVIII.
2. Investigar a presença de polimorfismos nas regiões intragênicas e promotoras dos genes das citocinas.
3. Verificar se há associação entre os haplótipos genéticos de citocinas e o risco de desenvolvimento de inibidores anti-FVIII.
4. Analisar as citocinas intracitoplasmáticas em leucócitos de sangue total de hemofílicos com e sem inibidor de FVIII.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. Aprovação da metodologia adotada**

A pesquisa “Avaliações imunogenéticas do desenvolvimento de anticorpos inibidores do fator VIII na Hemofilia A: polimorfismos e expressão de citocinas e biotecnologia de peptídeos sintéticos” norteou a metodologia adotada neste trabalho. O referido projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOMINAS (Registro nº 146).

### **3.2. Equipamentos utilizados**

- Agitador magnético Marconi MA085;
- Autoclave Primatec CS (Vertical);
- Balanças analíticas ANB, modelos FX-40 e AE-200;
- Banho Maria Fanem;
- Bomba de vácuo KNF Neuberger UN726.3 FTP;
- Centrífuga Hermle Z 323K;
- Citômetro de fluxo FACSCalibur™ (BD Biosciences);
- Coagulômetro Option 8 – Biomérieux;
- Concentrador de amostras a vácuo Univapo 100H – Uniequip;
- Coluna de cromatografia  $\mu$ RPC C18 (Amersham Pharmacia Biosciences);
- Destilador Millipore – Milli-Ro Plus 90;
- Espectrofotômetro Shimadzu UV-160;
- Espectrômetro de massa Q-TOF micro™ (Micromass, Manchester, UK);
- HPLC – Shimadzu – CR4A Chromatopac;
- Leitor de ELISA Reader 230S Organon Teknika;
- pHmetro TecnoPON PA200;
- Pipetas automáticas Pipetman-Gilson;
- Sintetizador automático Abimed AMS 422;
- Vortex Vertex QL-901;

### **3.3. Bloqueio e purificação de anticorpos anti-FVIII por peptídeos sintéticos:**

#### **3.3.1. Descrição das amostras:**

Amostras de 5,0mL de sangue periférico de 13 pacientes que recebem atendimento na Fundação Hemominas foram coletadas em tubos *vacutainer* contendo citrato de sódio (BD, Franklin Lakes, NJ, USA). O sangue coletado foi centrifugado a 3.000rpm por 15 minutos e o plasma pobre em plaquetas foi congelado a -20°C.

Todos os indivíduos apresentavam histórico de desenvolvimento de inibidores. Um paciente participou de duas coletas em momentos distintos. A idade média dos pacientes foi de 17,6 anos (5-45 anos). Sete pacientes foram diagnosticados com hemofilia A grave, cinco com a forma moderada e um com a forma branda da doença.

#### **3.3.2. Quantificação dos inibidores:**

Para quantificar os inibidores do FVIII foi realizado o método de Bethesda (VERBRUGGEN et al., 1995). Antes de proceder ao teste de Bethesda construiu-se uma curva-padrão de referência da atividade de FVIII em *pool* de plasmas de indivíduos não hemofílicos, com concentrações normais de FVIII plasmático. Para isto seguiu-se o seguinte protocolo:

- 1- Foi feita uma diluição de 1:2 do pool de plasmas normais utilizando tampão imidazol 0,05M, NaCl 0,1M, pH 7,4 em tubos plásticos, perfazendo um volume de 400µL. Os tubos foram homogeneizados e seguiu-se uma diluição seriada em tampão imidazol até 1:64;
- 2- Foram adicionados 200µL de *pool* de plasmas normais em todos os tubos;
- 3- Os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C por 2 horas e homogeneizados a cada 20 minutos;
- 4- Após 2 horas de incubação, os tubos foram colocados em banho de gelo;
- 5- Dosou-se o FVIII dos tubos conforme o esquema:
  - Escolheu-se aleatoriamente uma das diluições feitas anteriormente e essa foi diluída em tampão imidazol 0,05M, NaCl 0,1M, pH 7,4 na proporção de 1:10;

- 100µL dessa nova solução foram transferidos para as canaletas do coagulômetro;
- Foram adicionados em cada canaleta, 100µL de cefalina (Biopool International, Ventura, CA, USA) e 100µL de substrato deficiente em FVIII (Biopool International, Ventura, CA, USA);
- Pequenas esferas de metal foram colocadas no interior das canaletas das misturas e essas incubadas por 4 minutos a 37°C;
- Foram adicionados 100µL de cloreto de cálcio 2,5mM
- Com a formação do coágulo sobre a esfera o equipamento registra o tempo de coagulação em segundos;
- Utilizando o tempo de coagulação das diluições do pool de plasmas normais, construiu-se a curva padrão de atividade de FVIII.

O teste de Bethesda foi realizado com o seguinte protocolo:

- 1- Foi feita uma diluição 1:2 dos plasmas coletados utilizando tampão imidazol em tubos plásticos, perfazendo um volume de 400µL. Os tubos foram homogeneizados e seguiu-se uma diluição seriada em tampão imidazol até 1:64;
- 2- Foi feita uma solução controle: 200µL de tampão imidazol e 200µL de pool de plasmas normais;
- 3- Foram adicionados 200µL de pool de plasmas normais em todos os tubos;
- 4- Os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C por 2 horas e homogeneizados a cada 20 minutos;
- 5- Após 2 horas de incubação, os tubos foram colocados em banho de gelo;
- 6- Dosou-se o FVIII dos tubos, inclusive da solução controle, conforme o esquema:
  - Escolheu-se aleatoriamente uma das diluições do plasma do paciente feita anteriormente e essa foi diluída em tampão imidazol na proporção de 1:10;
  - 100µL dessa nova solução foram transferidos para as canaletas do coagulômetro;
  - Foram adicionados em cada canaleta, 100µL de cefalina (Biopool International, Ventura, CA, USA) e 100µL de substrato deficiente em fator VIII (Biopool International, Ventura, CA, USA);
  - Pequenas esferas de metal foram colocadas no interior das canaletas das misturas e essas incubadas por 4 minutos a 37°C;

- Foram adicionados 100µL de cloreto de cálcio 2,5mM;
- Foi medido o tempo de coagulação;
- Determinou-se a porcentagem de FVIII residual das amostras utilizando-se a curva padrão da atividade de FVIII;

7- Calculou-se a atividade do FVIII residual (FVIIIres) da seguinte forma:

$$\frac{\% \text{ de FVIII(res) da amostra do paciente}}{\% \text{ de FVIII(res) do tubo controle}} \times 100$$

8- O resultado obtido foi transformado utilizando a tabela de conversão de atividade do FVIII residual para Unidades de Bethesda;

**Tabela 1.** Conversão de atividade do FVIII residual a Unidades de Bethesda/mL.

<b>Atividade de FVIII (%)</b>	<b>UB/mL</b>
75	0,4
70	0,5
65	0,6
61	0,7
57	0,8
53	0,9
50	1,0
46	1,1
43	1,2
40	1,3
38	1,4
35	1,5
33	1,6

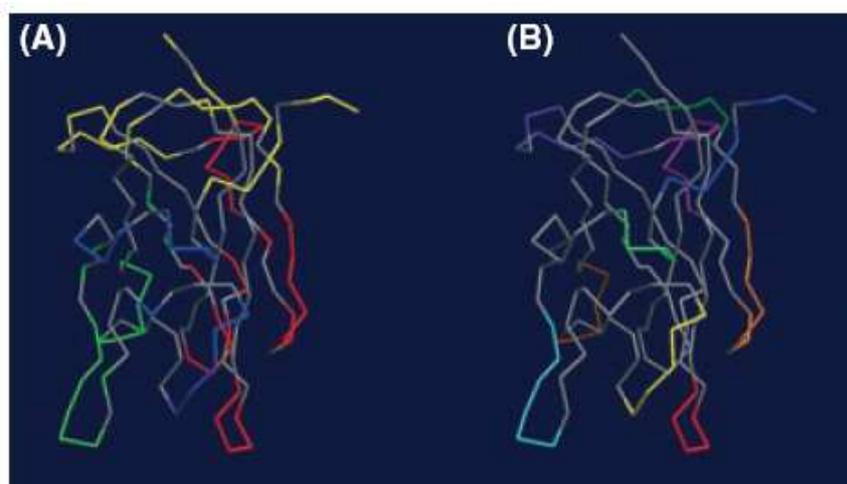
9- Se a atividade do FVIII residual na diluição utilizada foi menor que 33%, diluições maiores do plasma foram feitas e o teste de Bethesda nessas amostras foi repetido. Por outro lado, se a atividade foi maior que 75%, diluições menores do plasma foram feitas e testadas;

10- Os títulos em UB referentes a cada diluição foram então multiplicados pelo fator de diluição do plasma utilizado para o teste. Dessa forma, obteve-se a titulação real de inibidores do indivíduo selecionado;

### 3.3.3. Predição de epitopos e desenho de peptídeos:

Possíveis epitopos no domínio C2 do FVIII foram definidos usando a ferramenta computacional PEPOP (MOREAU et al., 2008) que identifica segmentos expostos na estrutura tridimensional da proteína e os agrupa em epitopos descontínuos. A partir da estrutura tridimensional do FVIII, a acessibilidade de solvente à superfície da proteína foi calculada usando o programa DSSP (KABSCH & SANDER, 1983). Segmentos compostos por aminoácidos acessíveis e contíguos foram selecionados sendo que um segmento pode ser constituído por um único aminoácido. Cada segmento foi aproximado a um segmento geométrico representado por três pontos: o C $\alpha$  dos resíduos das porções N-terminal e C-terminal do segmento. O ponto médio foi selecionado entre os dois pontos referidos. Dessa forma, cada segmento foi representado por coordenadas 3D (X, Y, Z). Uma matriz contendo as menores distâncias entre os segmentos foi definida e usada para agrupar os segmentos. Esse agrupamento foi realizado utilizando o Kitsch (*Phylogeny Inference Package* [PHYLIB] 3.6) (FELSENSTEIN, 1989). As coordenadas atômicas do domínio C2 do FVIII humano, como definido por cristalografia de raios X (PRATT et al., 1999), foram utilizadas (PDB entry: 1D7P). Peptídeos sintéticos foram desenhados após inspeção visual dos segmentos. O segmento 21 (2275FQNGKVKV2282; agrupamento 1) se destaca no centro do domínio, formando uma volta, com as porções N- e C-terminal distantes uma da outra (>15 Å); o peptídeo cíclico 91 AcCLFFQNGKVKVCAAC(Acm) foi desenhado para mimetizar esse epitopo. O segmento 24 (2290FTPVV2294; agrupamento 1) corresponde a uma folha- $\beta$  e ao início de uma volta; outro curto segmento exposto (segmento 23, 2287QD2288) é espacialmente próximo ao segmento 24; o peptídeo cíclico 92 AcCQGNQDSFTPVVCAAC(Acm) compreende os dois segmentos. O segmento 16 (2249KSLLT2253; agrupamento 1) corresponde a uma volta de uma estrutura *hairpin* bem exposta; o peptídeo sintético 93 AcCGVKSLLTSMYCAAC(Acm) consiste essa volta acrescida de resíduos flanqueadores e duas cisteínas que funcionam como sustentação da estrutura de *hairpin*. O segmento 3 (2181ESKA2184; agrupamento 2) se assemelha ao segmento 21, mas com menor exposição ao solvente; o peptídeo linear 94 AcPLGMESKAISDAQITAAAC(Acm) foi desenhado para mimetizar esse epitopo. O segmento 10 (2211HLQGR2215; agrupamento 2) corresponde a uma extensa superfície exposta que foi mimetizada pelo peptídeo cíclico 95 AcCSKARLHLQGRSNACAAC(Acm). O segmento 7 (2195YFTNMF2200;

agrupamento 3) faz parte de uma folha- $\beta$  e de uma volta; o peptídeo cíclico 96 AcCYFTNMFATWCAAC(Acm) foi desenhado para reproduzir esse segmento. O segmento 12 (2222QVNNPK2227; agrupamento 3) corresponde a uma grande superfície de um *loop* próximo ao segmento 13, o resíduo de triptofano 2229; o peptídeo cíclico 97 AcCRPQVNNPKEWSCAAC(Acm) incorporou os segmentos 12 e 13. O segmento 20 (2269HQWTL2273; agrupamento 4) corresponde a uma folha- $\beta$  e o início de uma volta; O peptídeo 98 AcCSSSQDGHQWTLCAAC(Acm) também incorporou o segmento 19 (2266QD2267), o qual é parte do final da volta. O segmento 26 (2298DPPLL2302; agrupamento 4) se sobressai na superfície do domínio C2 com suas porções N- e C-terminal em posições opostas; o peptídeo linear AcVNSLDPPLLTRYAAC(Acm) foi desenhado para mimetizar essa parte da proteína. O peptídeo 98 possui um epítipo conhecido formado pela seqüência de aminoácidos DGHQ que é reconhecida pelo anticorpo murino monoclonal ESH8 (SCANDELLA et al., 1995; VILLARD et al., 2002). Finalmente, os segmentos 1 (2171LNS2173) e 2 (2176MPL2178) no final da porção N-terminal do domínio C2; o peptídeo 90 LNSSSMPLGMESKAISAAC(Acm), com uma cisteína substituída por uma serina, foi preparado para mimetizar essas porções (Figura 5). Foi incluído no estudo um peptídeo previamente definido correspondente a um epítipo na região acídica  $\alpha 1$  do FVIII (peptídeo 89; AcLTDSEMDVVRFDAAC) (RAUT et al., 2003). A seqüência dos peptídeos utilizados está apresentada na tabela 2.



**Figura 5:** Segmentos expostos e agrupamentos na superfície do domínio C2 do FVIII. As coordenadas atômicas do domínio C2 (PRATT et al., 1999) foram usadas como entrada para o programa computacional PEPOP para identificar segmentos expostos e agrupamentos como possíveis epítopos antigênicos. (A) Os 33 segmentos expostos agrupados. Vermelho, agrupamento 1; azul, agrupamento 2; verde, agrupamento 3; vermelho, agrupamento 4. (B) Os segmentos selecionados para o desenho dos peptídeos. Azul escuro, segmentos 1 e 2; verde, segmento 3; azul claro, segmento 7; amarelo, segmento 10; marrom, segmentos 12 e 13; vermelho, segmento 16; roxo, segmentos 19 e 20; violeta, segmento 21, laranja, segmentos 23 e 24; verde escuro, segmento 26.

**Tabela 2:** Seqüência dos peptídeos definidos como epítopos do FVIII.

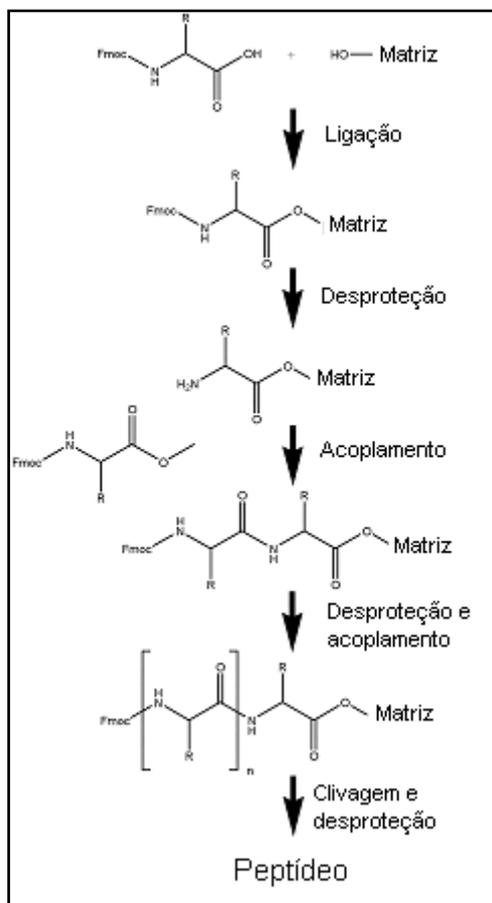
Peptídeo	Seqüência*	Origem	Massa (Da)
89	LTDSEMDVVRFDAAC	Região acídica a1	1.741,9
90	LNSSSMPLGMESKAISAAC	C2, segmento 1 + 2	1.965,8
91	CLFFQNGKVKCAAC	C2, segmento 21	1.738,8
92	CQGNQDSFTPVVCAAC	C2, segmento 24 + 23	1.751,6
93	CGVKSLLTSMYCAAC	C2, segmento 16	1.658,7
95	CSKARLHLQGRSNACAAC	C2, segmento 10	1.995,9
96	CYFTNMFATWCAAC	C2, segmento 7	1.738,6
97	CRPQVNNPKEWSCAAC	C2, segmento 12 + 13	1.914,8
98	CSSSQDGHQWTLCAAC	C2, segmento 20	1.805,6
99	VNSLDPPLLTRYAAC	C2, segmento 26	1.743,8

\*Peptídeos foram acetilados na porção N-terminal (exceto peptídeos 89 e 90) e receberam grupamento amina na porção C-terminal. A sulfidrila da cisteína C-terminal foi bloqueada pelo grupamento acetamidometil. Peptídeos 91, 92, 93, 95, 96, 97 e 98 foram oxidados para formação de ligações dissulfeto entre suas cisteínas internas.

### 3.3.4. Síntese de peptídeos solúveis:

Os peptídeos definidos foram sintetizados em sintetizador automático Abimed AMS422 (Abimed Analysen, Langenfeld, Germany) pela técnica Fmoc (GAUSEPOHL et al., 1992) de acordo com protocolos previamente definidos (LAUNE et al., 2002). Todos os

peptídeos receberam uma cisteína modificada (Acm-Cys) em sua porção C-terminal para posterior desbloqueio e acoplamento em suporte sólido via formação de ligação dissulfeto. O esquema geral da estratégia de síntese Fmoc é mostrado na figura 6.



**Figura 6:** Esquema de síntese de peptídeos pela estratégia Fmoc ([http://www.anaspec.com/html/peptide\\_notes.html](http://www.anaspec.com/html/peptide_notes.html) - Modificado)

Quando necessário, duas cisteínas modificadas (S-Trityl Cys) foram incorporadas na seqüência para permitir a formação de uma ligação dissulfeto e conseqüente ciclização do peptídeo. Após a síntese, os peptídeos foram desprotegidos, retirados da resina com tratamento de ácido trifluoroacético (TFA) como descrito anteriormente (LAUNE et al., 2002). Todos os peptídeos receberam dois resíduos de alanina antes da cisteína C-terminal. Peptídeos cíclicos foram oxidados na presença de 15% de dimetil sulfóxido (DMSO) em tampão acetato de amônia 0,1M, pH 7,5 por 48 horas (TAM et al., 1991). Os peptídeos foram purificados em sistema HPLC em coluna semi-preparativa C-18 e sua pureza foi mensurada em purificação em coluna de fase reversa C-18 analítica e espectrometria de massa. Todos os peptídeos apresentaram pureza maior que 80%.

### **3.3.5. Titulação das amostras de plasma:**

Placas de 96 poços (Nunc-Immuno Maxisorp; Nunc A/S, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas com 100 µL de FVIII derivado de plasma humano diluído em PBS 1X a 1 UI/mL (Hemofil M – Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL, USA) por 12 horas a 4°C. As placas foram lavadas e bloqueadas por 1 hora a 37°C com PBS 1X suplementado com 1% de BSA. As amostras de plasma diluídas em PBS 1X BSA 0,1% foram incubadas por 2 horas a 37°C. A ligação dos anticorpos ao FVIII imobilizado foi revelada pela adição do anticorpo anti-IgG humana conjugado com peroxidase diluído 1:1.000 por 1 hora a 37°C. A absorvância resultante foi mensurada a 492nm após adição de 50µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N.

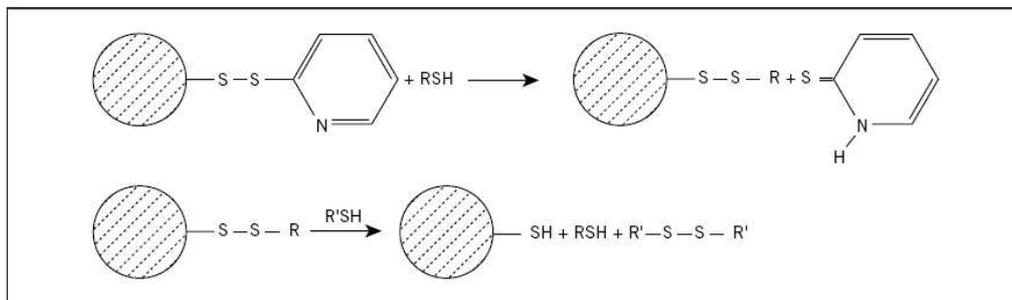
### **3.3.6. Purificação de anticorpos:**

IgGs das amostras de plasma dos pacientes foram purificadas usando coluna de proteína A (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As amostras foram diluídas em PBS 1X e incubadas com a resina por 2 horas a 4°C. Os anticorpos retidos na resina foram eluídos utilizando tampão glicina 0,1M pH 2,8. Após purificação, os concentrados de IgG passaram por processo de diálise contra PBS 1X pH 7,4.

### **3.3.7. Remoção de grupamento Acm e ligação do peptídeo à resina *Thiopropyl-Sepharose 6B*:**

Os peptídeos 89, 92 e 99 foram submetidos à remoção do grupamento acetamidometil (Acm) utilizando AgOTf. Os peptídeos e o AgOTf em excesso (40 molar) foram dissolvidos em 1,5mL de TFA na presença de 30µL de anisole e incubados a 4°C por 90 minutos. Após o período de incubação os peptídeos foram precipitados com 10mL de éter gelado, centrifugados e o precipitado foi lavado 3 vezes. A quantidade de peptídeos desprotegidos foi mensurada utilizando reagente de Ellman. Para acoplamento na resina, o pH da solução contendo o peptídeo foi ajustado para 6,5. Adicionalmente foi acrescentado EDTA em concentração final de 1mM e soluções contendo 5µmol de cada peptídeo foram incubadas por 12 horas com a resina *Thiopropyl Sepharose 6B* (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) a 4°C. A eficiência de ligação dos peptídeos foi

mensurada pela quantificação do anel de *2-thiopyridone* (leitura de absorvância a 343nm) livre na solução após sedimentação da resina. O esquema de ligação dos peptídeos à resina é mostrado na figura 7.



**Figura 7:** Esquema de ligação de biomoléculas via ligação dissulfeto à resina *Thiopropyl Sepharose 6B*.

### 3.3.8. Purificação de anticorpos anti-FVIII:

IgGs anti-FVIII previamente purificadas das amostras de plasma dos pacientes foram purificadas utilizando os peptídeos imobilizados em uma matriz sólida (Sepharose). Concentrados de IgGs foram diluídos 10 vezes em PBS 1X pH 7,4 e incubados sob agitação constante com a resina *Thiopropyl Sepharose 6B* contendo peptídeos acoplados (peptídeos em excesso – 20X) por 90 minutos à temperatura ambiente. A incubação foi seguida de centrifugação a 4.000rpm por 5 minutos e recuperação do sobrenadante. A resina foi lavada duas vezes com PBS 1X pH 7,4 e duas vezes com tampão glicina 0,1M pH 3,5. Os processos de lavagem foram seguidos de centrifugação e recuperação do sobrenadante, os quais foram armazenados separadamente. A concentração de IgGs não retidas na coluna foi mensurada utilizando absorvância a 280nm. As amostras foram analisadas em ELISA direto para verificar a remoção de anticorpos anti-FVIII nas mesmas condições utilizadas nos testes de titulação.

## 3.4. Polimorfismos em genes de citocinas

### 3.4.1. Descrição das amostras:

Amostras de 5,0mL de sangue periférico de 60 pacientes que recebem atendimento na Fundação Hemominas foram coletadas em tubos *vacutainer* contendo EDTA (BD,

Franklin Lakes, NJ, USA). O sangue coletado foi centrifugado a 3.000rpm por 15 minutos e o concentrado de leucócitos foi separado e congelado a -20°C.

Metade dos pacientes possuía histórico de desenvolvimento de inibidores de FVIII. A idade média dos pacientes foi de 23,2 anos (6-58 anos). A maioria dos indivíduos (28) é classificada como de alta resposta ao FVIII.

### **3.4.2. Extração e quantificação de DNA:**

O DNA genômico das amostras coletadas em EDTA foram extraídos de acordo com o protocolo abaixo:

- 300µL de concentrado de leucócitos foram incubados com 500µL de solução de lise celular (10mM Tris-HCl, 11% sacarose, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, pH 8,0).
- O tubo foi agitado vigorosamente e incubado à temperatura ambiente por 2 minutos.
- O tubo foi centrifugado por 5 minutos a 3.000rpm.
- O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 300µL de solução de lise celular.
- O tubo foi agitado vigorosamente.
- O tubo foi centrifugado por 5 minutos a 3.000rpm.
- O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 300µL de solução de lise nuclear (10mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 10mM citrato de sódio, 1% SDS, pH 8,0).
- Foram acrescentados 5µL de proteinase K (10mg/mL) e o tubo foi incubado por 4 horas a 56°C.
- Foram adicionados 100µL de NaCl (6 M) e 500µL de clorofórmio.
- O tubo foi centrifugado por 5 minutos a 3.000rpm.
- A fase aquosa formada foi transferida para tubo contendo 600µL de etanol absoluto, para precipitação do DNA.
- O DNA foi transferido para tubo contendo 50µL de H<sub>2</sub>O.
- Foi realizada quantificação do DNA em espectrofotômetro a 260nm.
- A concentração do DNA foi ajustada para 50ng/µL e o material foi armazenado em freezer a -20°C.

### **3.4.3. Amplificação e análise dos polimorfismos em genes de citocinas:**

A genotipagem de polimorfismos em genes de citocinas seguiu os protocolos de reações de PCR descritos previamente (MYHR *et al.*, 2002; FREIDIN *et al.*, 2003; JOHNSON *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2005). Para todas as reações realizadas o mix foi constituído por: 2,5pmol de cada primer, 2,0mmol de cada dNTP, 1,2µl de tampão de reação 10X, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5U de *Taq* DNA-polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 100–200ng de DNA genômico. Os fragmentos obtidos a partir das reações foram visualizados em gel de agarose 2% corados com brometo de etídeo expostos à luz ultravioleta. As condições das reações são descritas na tabela 3.

**Tabela 3:** Condições adotadas nas PCRs para genotipagem dos polimorfismos em genes de citocinas (IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$  e IL-10)

Citocina - SNP	Reagente (PCR-RFLP ou PCR-ASO)	Seqüência 5' $\rightarrow$ 3' / Endonuclease	Ciclos de temperatura da PCR	Fragmentos (pb) / Genótipos
IL-4 G/C 3'UTR rs não disponível (FREIDIN et al., 2003)	<i>Primer-F</i> <i>Primer-R</i> Enzima	CTCAGTACACCATATGCG CCAGTGACTATCATTATAATTCC 5U de Alw44I; 37°C por 3 h	94°C, 5 min 94°C, 45s; 60°C, 1 min; 72°C, 45s x 30 72°C, 8 min	269; 332 $\rightarrow$ GG 601 $\rightarrow$ CC 269; 332; 601 $\rightarrow$ GC
IL-5 C703T rs não disponível (FREIDIN et al., 2003)	<i>Primer-F</i> <i>Primer-R</i> Enzima	CAGGGAGAGCCAATCAGT ATGATGTCCAGACTCCAGGATCT 10U de AlwNI; 37°C por 3 h	94°C, 5 min 94°C, 45s; 60°C, 1 min; 72°C, 45s x 30 72°C, 8 min	18; 160 $\rightarrow$ CC 178 $\rightarrow$ TT 18; 160; 178 $\rightarrow$ CT
IL-10 G-1082A rs1800896 (WU et al., 2005)	<i>Primer-F</i> <i>Primer-R (G)</i> <i>Primer-R (A)</i>	GCAACACTCCTCGTCGCAAC CTATCCCCTACTTCCCCC CCTATCCCCTACTTCCCCT	94°C, 5 min 90°C, 30s; 60°C, 1 min; 72°C, 1 min x 30 72°C, 8 min	140 $\rightarrow$ A ou G
IL-10 C-592A rs1800872 (WU et al., 2005)	<i>Primer-F</i> <i>Primer-R</i> Enzima	ATAAAATAGAGACGGTAGGG GGCTAAATATCCTCAAAGTT 5U de RsaI; 37°C por 3 h	94°C, 5 min 95°C, 30s; 60°C, 1 min; 72°C, 1 min x 30 72°C, 8 min	68; 201 $\rightarrow$ AA 269 $\rightarrow$ CC 68; 201; 269 $\rightarrow$ AC
IL-10 C-819T rs1800871 (MYHR et al., 2002)	<i>Primer-F</i> <i>Primer-R</i> Enzima	ATCCAAGACAACACTACTAA TAAATATCCTCAAAGTTCC 10U de MaeIII; 37°C por 3 h	94°C, 5 min 90°C, 30s; 56°C, 30s; 72°C, 1 min x 30 72°C, 8 min	79; 217; 292 $\rightarrow$ CC 79; 509 $\rightarrow$ TT 79; 217; 292; 509 $\rightarrow$ CT
TNF- $\alpha$ A-308G rs1800629 (JOHNSON et al., 2004)	<i>Primer-F</i> <i>Primer-R</i> Enzima	AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT TCCTCCCCTGCTCCGATTCCG 6U de NcoI; 37°C por 3 h	94°C, 5 min 94°C, 30s; 60°C, 1 min; 72°C, 1 min x 30 72°C, 8 min	20; 87 $\rightarrow$ GG 107 $\rightarrow$ AA 20; 87; 107 $\rightarrow$ AG

#### **3.4.4. Análises estatísticas:**

Teste qui-quadrado foi utilizado para avaliar a associação entre os haplótipos definidos e a presença ou ausência de inibidores no histórico clínico dos pacientes. Todos os valores p menores que 0,05 foram considerados significativos.

### **3.5. Imunofenotipagem de leucócitos e produção diferencial de citocinas**

#### **3.5.1. Descrição das amostras:**

Foram coletadas amostras de 10mL de sangue periférico em tubos contendo heparina sódica (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) de 55 pacientes portadores de hemofilia A (25 com histórico de desenvolvimento de inibidores) atendidos na Fundação Hemominas. Foram também coletadas amostras de 30 indivíduos sadios do sexo masculino. A idade média foi de 23,3 anos (2-59 anos) para os pacientes sem inibidor, 23,3 anos (1-57 anos) para os pacientes com inibidor e 24,8 anos (18-65 anos) para os indivíduos sadios.

#### **3.5.2. Cultura de sangue total *in vitro* de curta duração:**

Amostras de sangue periférico foram utilizadas em culturas de curta duração e classificadas como “controle” e “estimuladas”. As culturas-controle foram realizadas em tubos de polipropileno de 14mL (BD, Franklin Lakes, NJ, USA), utilizando alíquotas de 1,25mL de sangue total incubadas na presença de 1,22mL de RPMI-1640 (Sigma, St Louis, MO, USA) e brefeldina A a 10µg/mL (BFA) (Sigma, St Louis, MO, USA) por 4 horas a 37°C em estufa a 5% de CO<sub>2</sub>. As culturas estimuladas foram realizadas de maneira similar à descrita, exceto pela incubação prévia de dois tubos contendo 1,25mL de sangue total e 250µL de FVIII (3,6µg/mL) (derivado de plasma e recombinante – ProSpec – Tany TechnoGene, Rehovot, Israel) por 1 hora nas mesmas condições utilizadas para as culturas-controle. Os controles positivos para as culturas foram realizados para verificação da viabilidade celular das amostras. Alíquotas de 625µL de sangue total foram incubadas na presença de 580µL de RPMI-1640, *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate* (PMA) (Sigma, St Louis, MO, USA) a 25ng/mL, ionomicina (Sigma, St Louis, MO, USA) a 1mg/mL e BFA a 10µg/mL. Os padrões de citocinas

observados nas culturas estimuladas com PMA (altos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) foram utilizados para confirmar a viabilidade celular das amostras.

### **3.5.3. Imunofenotipagem de subtipos celulares e citocinas intracelulares:**

Após o período de incubação, todas as culturas (CC, pdFVIII e rFVIII) foram tratadas com solução EDTA 2mM (Sigma, St Louis, MO, USA) por 10 minutos à temperatura ambiente e lavadas duas vezes com PBS-W (PBS 0,5% de soro-albumina bovina e 0,1% de azida sódica - Sigma, St Louis, MO, USA) por centrifugação a 1300rpm a 18°C por 7 minutos. As células foram marcadas no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente com anticorpos monoclonais marcados (*TriColor-labeled mAbs*) (Caltag, Burlingame, CA, USA), anti-CD4, CD8, CD14 ou CD19. Após procedimento de lise/fixação, os leucócitos foram permeabilizados por incubação com PBS-P (PBS-W suplementado com 0,5% de saponina - Sigma, St Louis, MO, USA) por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida as células foram incubadas por 30 minutos no escuro à temperatura ambiente na presença de 20 $\mu$ L anticorpos monoclonais anti-citocina marcados (*PE-labeled anti-cytokine mAbs*) (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5 e IL-10 – e Bioscience, San Diego, CA, USA) na presença de PBS-P. Após a marcação de citocinas intracitoplasmáticas, os leucócitos foram lavados com PBS-W e fixados com solução FACS FIX (10g/L de paraformaldeído, 10,2g/L de cacodilato de sódio e 6,63g/L de cloreto de sódio, pH 7,2 - Sigma, St Louis, MO, USA) e armazenados a 4°C por pelo menos 20 minutos antes da aquisição em citômetro de fluxo.

### **3.5.4. Aquisição em citômetro de fluxo e análises:**

Após o procedimento de imunofenotipagem, as suspensões de leucócitos foram lidas em citômetro de fluxo (FACScalibur<sup>®</sup> - Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) adquirindo 30.000 eventos/amostra. Os dados obtidos foram analisados usando o *software* CellQuest (BD, Franklin Lakes, NJ, USA). Distintas estratégias de seleção foram usadas para analisar a expressão de citocinas em subpopulações de leucócitos dos sistemas imunes inato (neutrófilos e monócitos) e adaptativo (subtipos de células T e linfócitos B). Os neutrófilos foram selecionados como células SSC<sup>High</sup>CD16<sup>High+</sup> e os monócitos como células CD14<sup>High+</sup> em FL3/anti-CD16-TC ou FL3/anti-CD14-TC *versus* SSC/*laser*

*side-scatter dot plots*, respectivamente. A população de linfócitos foi previamente selecionada em *FSC/laser forward-scatter versus SSC/laser side-scatter dot plots*. Seguindo a seleção inicial, as frequências de células citocina<sup>+</sup> foram quantificadas pela estatística dos quadrantes aplicando FL3/anti-CD4, CD8 ou CD19-TC *versus* FL2/anti-citocina-PE para subtipos de células T e linfócitos B. Os dados foram expressos como percentagem de células citocinas<sup>+</sup> dentre neutrófilos, monócitos e linfócitos totais selecionados. Os resultados foram reunidos para calcular o perfil de citocinas global como proposto por Vitelli-Avelar et al. (2008). A percentagem mediana para cada população de células citocina<sup>+</sup> foi calculada a partir de valores obtidos para toda a população estudada [HA $\alpha$ -FVIII(-), HA $\alpha$ -FVIII(-) e BD]. Seguindo a definição do ponto de corte entre baixos e altos produtores de citocinas para cada população celular, diagramas de cores foram criados para categorizar amostras individuais como baixos-produtores de citocinas, produtores de citocinas inflamatórias para células INF- $\gamma$ <sup>+</sup> e TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>, produtores de citocinas reguladoras para células IL-4<sup>+</sup>, IL-5<sup>+</sup> e IL-10<sup>+</sup>. A população celular caracterizada como grande produtora de citocinas inflamatórias e reguladoras foi classificada como de resposta mista.

### **3.5.5. Reatividade de IgG1 e IgG4 anti-FVIII:**

A verificação de reação anti-FVIII de IgG1 e IgG4 presentes no plasma de pacientes portadores de hemofilia A foi realizada como descrito anteriormente (CHAVES et al., 2008). Placas de 96 poços (Nunc-Immuno Maxisorp; Nunc A/S, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas *overnight* a 4°C com 100 $\mu$ L de FVIII derivado de plasma diluído em PBS 1X (1 UI/mL – HemofilM – Baxter, Deerfield, IL, USA). As placas foram lavadas e bloqueadas por 1h a 37°C com PBS 1X suplementado com BSA 1% (Sigma, St Louis, MO, USA). Diferentes diluições das amostras de plasma foram incubadas por 2h a 37°C usando PBS 1X suplementado com BSA 0,1% (Sigma, St Louis, MO, USA). A ligação de anticorpos anti-FVIII foi revelada usando anticorpos secundários anti-IgG1 e IgG4 humanas em um sistema de peroxidase (Sigma, St Louis, MO, USA) por 1h a 37°C. A absorbância resultante foi lida a 492nm após adição de 50 $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N em todos os poços.

### **3.5.6. Análises estatísticas:**

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA). Foi assumida distribuição não-gaussiana e as comparações estatísticas foram realizadas usando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de comparação múltipla de Dunns para avaliar o perfil de citocinas entre os grupos HA $\alpha$ -FVIII(-), HA $\alpha$ -FVIII(-) e BD. As análises comparativas entre a cultura controle e a cultura estimulada foram realizadas por teste de Wilcoxon para amostras pareadas. A frequência de altos e baixos produtores de citocinas foi comparada por teste qui-quadrado. As diferenças foram consideradas significativas quando os valores de p foram <0.05.

## **4. RESULTADOS**

#### 4.1. Bloqueio e purificação de anticorpos anti-FVIII por peptídeos sintéticos:

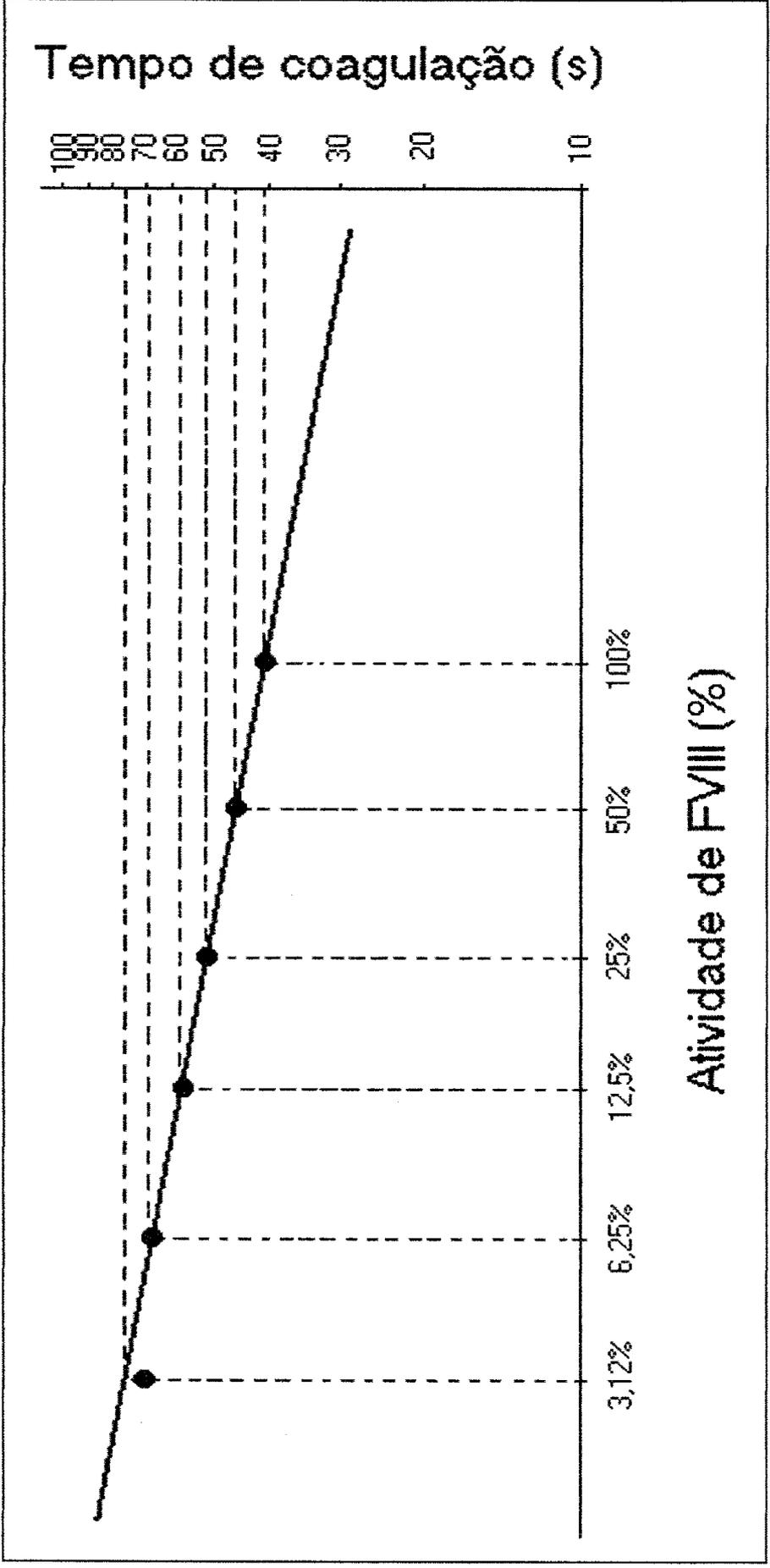
##### 4.1.1. Quantificação de inibidores de FVIII pelo teste de Bethesda:

As 14 amostras de plasma dos sujeitos da pesquisa foram quantificadas quanto à presença de inibidores do FVIII utilizando-se o teste de Bethesda. A curva padrão de FVIII, traçada a partir de *pool* de plasma de indivíduos normais, é apresentada na figura 8. Dentre as amostras coletadas, seis não tiveram inibidores de FVIII detectados pelo teste de Bethesda e confirmados por ELISA. A tabela 4 mostra os resultados positivos para inibidores de FVIII dos sujeitos da pesquisa.

**Tabela 4:** Título de Bethesda das amostras coletadas

<b>Amostra</b>	S01	S02a	S02b	S03	S04	S05	S06	S07
<b>UB/mL</b>	12,0	5,2	16,0	3,6	1,8	5,4	3,0	8,0

\*A02; paciente participou de duas coletas em períodos diferentes.



**Figura 8:** Curva padrão de porcentagem de FVIII ativo em *pool* de plasmas de indivíduos saudáveis.

#### 4.1.2. Integridade dos peptídeos sintéticos

Os peptídeos sintetizados e purificados tiveram suas massas confirmadas por espectrometria de massa. As massas e as características de ionização encontradas estão listadas na tabela 5, sendo que todas correspondem aos peptídeos utilizados.

**Tabela 5:** Massas e padrão de ionização dos peptídeos definidos por espectrometria de massas\*.

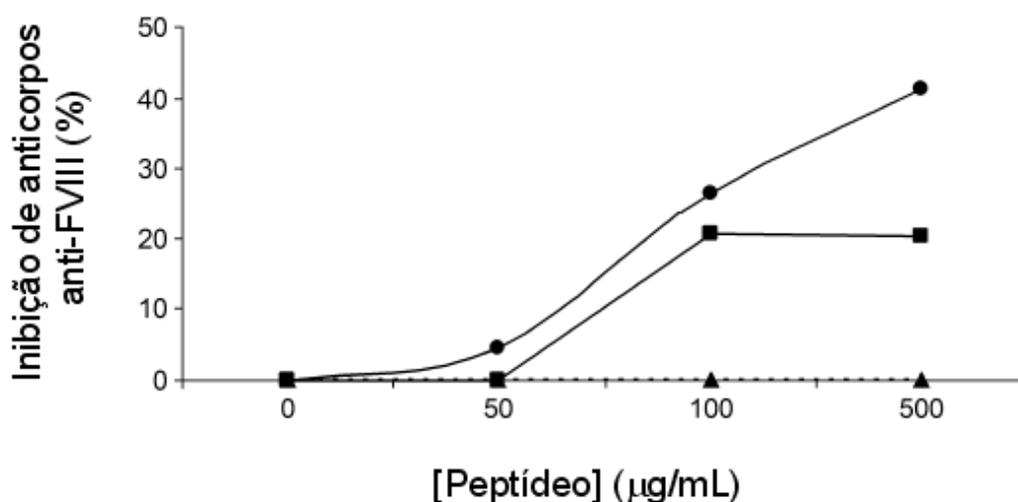
Peptídeo	Massa esperada (Da)	Massa encontrada (Da)	Formas ionizadas encontradas (m/z)
89	1741,9	1740,87 ± 0,48	M + H <sup>+</sup> = 1741,87 M + 2H <sup>+</sup> = 871,42
90	1965,8	1966,98 ± 0,03	M + H <sup>+</sup> = 1967,98 M + 2H <sup>+</sup> = 984,45 M + 3H <sup>+</sup> = 656,60
91	1738,8	1738,98 ± 0,49	M + H <sup>+</sup> = 1741,98 M + 2H <sup>+</sup> = 870,98 M + 3H <sup>+</sup> = 580,60
92	1751,6	1750,9 ± 0,01	M + Na <sup>+</sup> = 1775,96 M + H <sup>+</sup> + Na <sup>+</sup> = 898,96
93	1658,7	1657,02 ± 0,01	M + H <sup>+</sup> = 1660,02 M + 2H <sup>+</sup> = 831,30 M + H <sup>+</sup> + Na <sup>+</sup> = 841,50
95	1995,9	1995,66 ± 0,46	M + H <sup>+</sup> = 1998,66 M + 2H <sup>+</sup> = 1000,16 M + 3H <sup>+</sup> = 667,11 Desp. + 3H <sup>+</sup> = 643,43
96	1738,6	1737,72 ± 0,01	M + Mg <sup>+</sup> = 1764,03 M + Mg <sup>2+</sup> = 890,49
97	1914,8	1915,32 ± 0,02	M + H <sup>+</sup> = 1918,32 M + 2H <sup>+</sup> = 959,64 Desp. + 2H <sup>+</sup> = 923,62
98	1805,6	1805,13 ± 0,55	M + H <sup>+</sup> = 1808,13 M + 2H <sup>+</sup> = 904,06 Desp. + 2H <sup>+</sup> = 868,54
99	1743,8	1744,34 ± 0,48	M + H <sup>+</sup> = 1745,34

\*Massa de íons: H<sup>+</sup> = 1,0 Da; Na<sup>+</sup> = 22,9 Da; Mg<sup>2+</sup> = 24,3 Da.

#### 4.1.3. Bloqueio e purificação de anticorpos anti-FVIII por peptídeos sintéticos:

Os ensaios de imunocompetição mostraram que todos os 10 peptídeos bloqueavam a ligação dos anticorpos ao FVIII. A figura 8 apresenta exemplos do bloqueio dessa ligação de forma dose dependente e específica pelos peptídeos 92, 93 e um peptídeo

controle negativo quando testados com a amostra S6. Foi verificado que a capacidade de bloqueio de anticorpos anti-FVIII aumentou juntamente com a concentração do peptídeo utilizado. O resultado indicou que apesar de serem moléculas de pequeno tamanho, os peptídeos utilizados apresentaram habilidade de mimetizar epitopos reconhecidos pelos anticorpos presentes no plasma dos pacientes. Cada amostra de plasma testada reagiu de forma distinta, resultado consistente com a visão de que diferentes epitopos são reconhecidos pelos anticorpos anti-FVIII. Reatividades específicas foram observadas para cada amostra testada (Figura 9). Anticorpos presentes em algumas amostras (S2, S3, S6 e S7) foram bloqueados por vários peptídeos, ao passo que as amostras S1, S4 e S5 não apresentaram facilidade de bloqueio de seus anticorpos pelos peptídeos sintéticos. É importante salientar que as amostras S2A e S2B, correspondentes às amostras de plasma de um mesmo paciente, mostraram perfis de reatividade distintos, evidenciando mudanças na especificidade de anticorpos anti-FVIII durante o tratamento. Analisando a eficiência de bloqueio de anticorpos para cada peptídeo (Figura 10), os peptídeos mais reativos foram definidos para as diferentes concentrações testadas. Os resultados indicaram que os peptídeos 89, 92 e 93 apresentaram maior capacidade bloqueadora de anticorpos (Figura 10). Os peptídeos 89 e 92 foram capazes de bloquear anticorpos em quatro amostras de plasma e o peptídeo 93 bloqueou anticorpos de seis das oito amostras testadas.



**Figura 9:** Capacidade de neutralização de anticorpos anti-FVIII pelos peptídeos 92 (●), 93 (■) e peptídeo controle negativo (MGEFKVDKFNIEDFFSGAGC) (▲). Resultado representativo utilizando plasma da amostra S6.

(A)

Amostras	P89	P90	P91	P92	P93	P95	P96	P97	P98	P99
S1									Yellow	
S2A	Yellow			Yellow			Yellow			
S2B	Yellow				Orange	Orange			Yellow	Orange
S3					Yellow	Yellow	Yellow			
S4								Yellow		Yellow
S5									Yellow	
S6	Yellow		Yellow	Yellow			Yellow	Yellow		
S7		Yellow	Orange	Yellow	Yellow	Yellow		Yellow	Yellow	

(B)

Amostras	P89	P90	P91	P92	P93	P95	P96	P97	P98	P99
S1									Yellow	
S2A	Yellow	Yellow		Yellow	Yellow		Yellow	Yellow		
S2B	Yellow				Orange	Orange			Orange	Orange
S3				Yellow	Yellow	Yellow	Yellow			
S4								Yellow		Yellow
S5									Yellow	
S6	Orange		Orange	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Orange		
S7	Orange	Yellow								

(C)

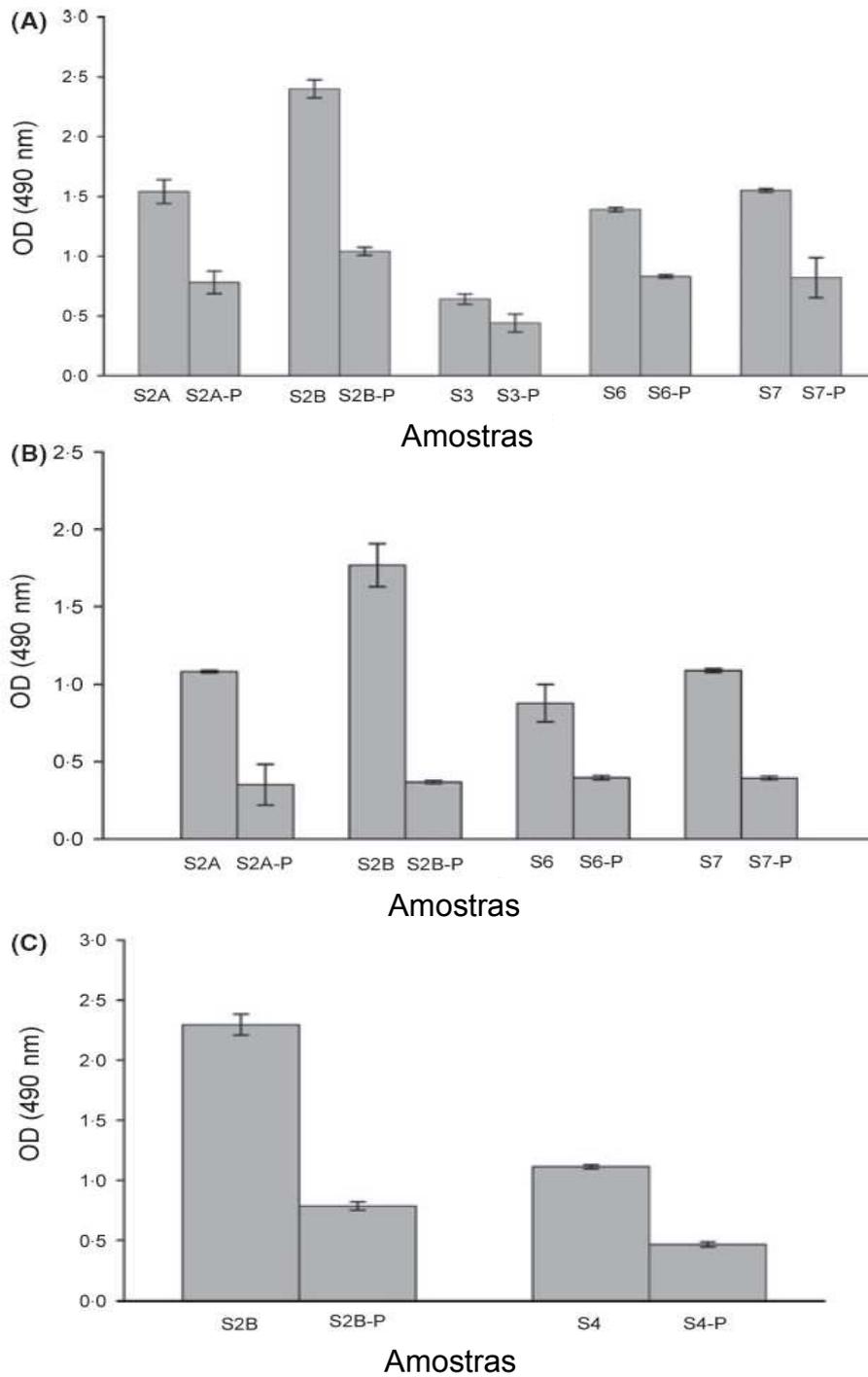
Amostras	P89	P90	P91	P92	P93	P95	P96	P97	P98	P99
S1									Orange	
S2A	Orange	Orange		Red	Orange		Orange	Orange		
S2B	Orange			Orange	Orange	Orange			Orange	Red
S3				Orange	Yellow	Yellow	Yellow			
S4					Orange			Yellow		Orange
S5							Orange		Yellow	
S6	Orange		Orange	Orange	Yellow	Orange	Orange	Orange		
S7	Red	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Yellow	Orange	Orange	

Cor	Atividade
	0%
Yellow	< 30%
Orange	30-60%
Red	> 60%

**Figura 10:** Perfil de atividade bloqueadora de todos os peptídeos testados quando utilizados a (A) 50, (B) 100 e (C) 500 $\mu$ g/mL.

Os peptídeos 89, 92 e 99 que apresentaram maior capacidade bloqueadora tiveram seu grupamento protetor Acm removido e foram acoplados como ligante da resina *Thiopropyl Sepharose 6B*. Esse procedimento permitiu a montagem de cromatografia de afinidade para remover anticorpos anti-FVIII do plasma de pacientes portadores de hemofilia A. O rendimento das desproteções dos peptídeos 92 e 99 pelas reações de Ellman foram de 85% e 90%, respectivamente. A ligação à resina foi completa para o peptídeo 92 e teve um rendimento de 47% e de 8% para os peptídeos 99 e 89, respectivamente.

As três matrizes de afinidade foram utilizadas para purificar anticorpos peptídeo-reativos de um *pool* de IgGs derivadas de plasma de pacientes portadores de hemofilia A. Para acessar a eficiência do processo, a reatividade anti-FVIII foi mensurada antes e após a purificação das IgGs por ELISA (Figura 11). Uma redução significativa de anticorpos anti-FVIII pode ser observada em todas as amostras purificadas: foram verificadas reduções médias de 63%, 45% e 62% da reatividade anti-FVIII por ELISA quando os anticorpos foram purificados utilizando os peptídeos 89, 92 e 99, respectivamente. Entretanto, nenhuma diferença significativa pode ser observada quando as mesmas amostras foram testadas quanto à capacidade de bloqueio da atividade pró-coagulante de FVIII em ensaio de Bethesda.



**Figura 11:** Resultados de ELISA comparando a ligação ao FVIII de IgG total e frações de IgGs não retidas em cromatografia de afinidade pelos peptídeos 89(A), 92(B) e 99(C). A mesma concentração de anticorpos foi usada para todas as amostras (2µg/well). Amostras após purificação identificadas com a letra P.

## 4.2. Polimorfismos em genes de citocinas

Os resultados das genotipagens não mostraram correlação entre os polimorfismos nos genes de IL-4, IL-5 e TNF- $\alpha$  e o desenvolvimento de inibidores em pacientes portadores de hemofilia A. Entretanto, os haplótipos analisados para os polimorfismos no gene de IL-10 (Tabela 6) apresentaram correlação significativa com os dois grupos de pacientes estudados. O haplótipo GCC/ATA apresentou associação significativa com o grupo de pacientes sem histórico de desenvolvimento de inibidores ( $p = 0,043$  e *Odds Ratio* = 3,55; 95% IC = 1,01-12,57). Dessa forma, os indivíduos com esse haplótipo, associado com produção intermediária de IL-10, têm 3,55 maior chance de ser negativo para inibidores de FVIII quando comparado com outros pacientes que não possuem esse haplótipo. Por outro lado, o haplótipo GCC/ACC, que está associado à produção alta/intermediária de IL-10, apresentou associação significativa com o grupo de pacientes com histórico de desenvolvimento de inibidores de FVIII ( $p = 0,0267$  e *Odds Ratio* = 5,82; 95% IC = 1,11-30,56). Neste caso, indivíduos que possuem esse haplótipo têm 5,82 vezes maior chance de apresentar inibidores de FVIII que os pacientes que não possuem esse haplótipo.

**Tabela 6:** Resultados das análises de haplótipos do gene de IL-10 (-1082;-819;-592 SNPs)

Haplótipos de IL-10	Inibidores de FVIII		Total	Valor p
	Negativos	Positivos		
GCC/ATA	11	5	16	<b>0.0439</b>
GCC/GCC	2	2	4	0.9335
GCC/ACC	2	9	11	<b>0.0250</b>
ATA/ATA	1	3	4	0.3371
ATA/ACC	6	3	9	0.2162
ATA/ATC	2	4	6	0.4433
<b>Total</b>	24	26	50	

Nessas análises, 10 pacientes foram excluídos por não portarem haplótipos definidos que apresentam desequilíbrio de ligação (SCASSELLATI *et al.*, 2004), por estarem distribuídos igualmente entre os dois grupos de pacientes ou por serem encontrados em apenas um grupo de pacientes. Os genótipos na região promotora do gene de IL-10 dos dez pacientes excluídos estão listados na tabela 7.

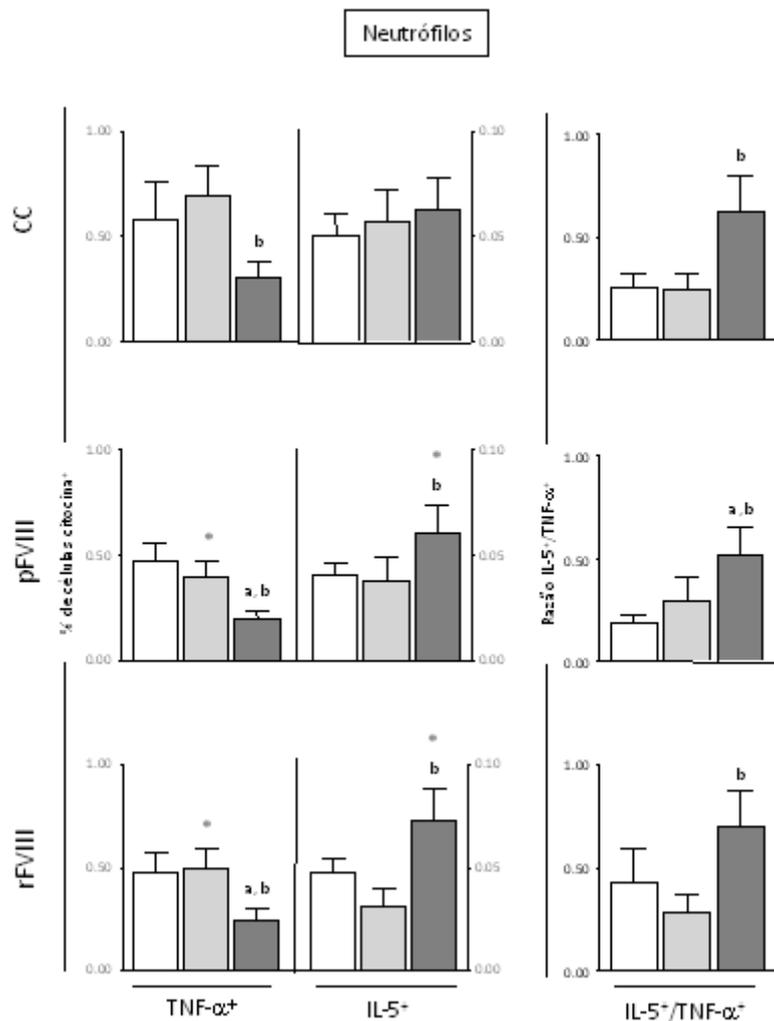
**Tabela 7:** Genótipos da região promotora do gene IL-10 dos pacientes que não tiveram haplótipos definidos.

ID do paciente	Genótipo de IL-10			Inibidores de FVIII
	-1082	-819	-592	
N01	GG	TT	AA	Negativo
N02	AG	TT	AC	Negativo
N03	AA	CC	CC	Negativo
N04	AA	CC	CC	Negativo
N05	GG	CT	AC	Negativo
N06	AA	CC	CC	Negativo
N07	AG	TT	AC	Negativo
P11	AA	CC	CC	Positivo
P20	GG	CT	CC	Positivo
P30	GG	CT	AC	Positivo

### 4.3. Imunofenotipagem de leucócitos e produção diferencial de citocinas

Baixos níveis de neutrófilos  $\text{TNF-}\alpha^+$  e valores altos de razão IL-5/ $\text{TNF-}\alpha$  são característico de  $\text{HA}\alpha\text{-FVIII}(+)$ . As análises do perfil de citocinas de neutrófilos mostraram menores freqüências de células  $\text{TNF-}\alpha^+$  no grupo  $\text{HA}\alpha\text{-FVIII}(+)$  quando comparadas aos outros dois grupos testados (Figura 12). Após estímulo com FVIII todos os grupos testados apresentaram níveis menores de  $\text{TNF-}\alpha$  quando comparados à cultura controle. Entretanto, apenas no grupo  $\text{HA}\alpha\text{-FVIII}(-)$  pode-se observar redução significativa dessa citocina. A imunofenotipagem de neutrófilos  $\text{IL-5}^+$  revelou um aumento significativo dessa citocina no grupo  $\text{HA}\alpha\text{-FVIII}(+)$  quando estimulado com FVIII.

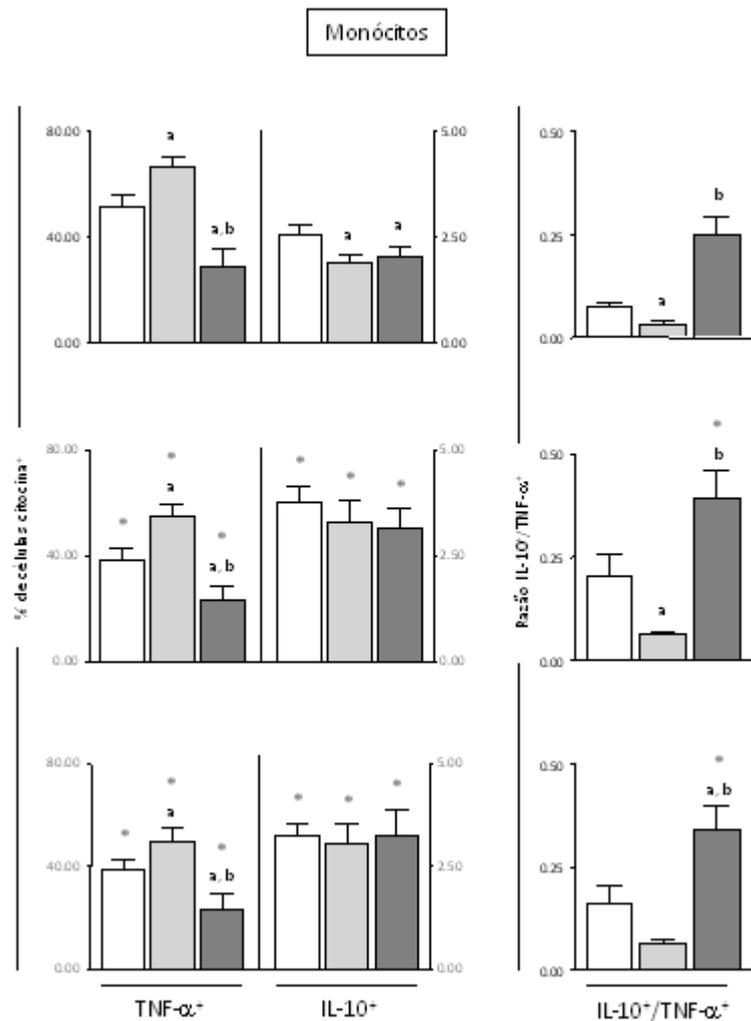
Não podem ser verificadas também diferenças entre os dois tipos de FVIII utilizados (derivado de plasma - pdFVIII ou recombinante - rFVIII). A estimulação *in vitro* com FVIII aumentou a freqüência de neutrófilos  $\text{TNF-}\alpha^+$  no grupo  $\text{HA}\alpha\text{-FVIII}(-)$  e de neutrófilos  $\text{IL-5}^+$  no grupo  $\text{HA}\alpha\text{-FVIII}(+)$ . Mesmo que nenhuma alteração foi observada na razão IL-5/ $\text{TNF-}\alpha$ , esse resultado é predominantemente encontrado no grupo  $\text{HA}\alpha\text{-FVIII}(+)$ .



**Figura 12:** Perfil de citocinas de neutrófilos do sangue periférico de indivíduos saudáveis (barras brancas), HAα-FVIII(-) (barras cinza-claro) e HAα-FVIII(+) (barras cinza-escuro). Dados de cultura controle e estimuladas com FVIII (pdFVIII e rFVIII). Diferenças estatísticas foram representadas pelas letras “a”, “b” e “c” para comparações com os grupos BD, HAα-FVIII(-) e HAα-FVIII(+) respectivamente. Diferenças significativas entre os tipos de cultura dentro de um mesmo grupo foram marcadas com “\*.”

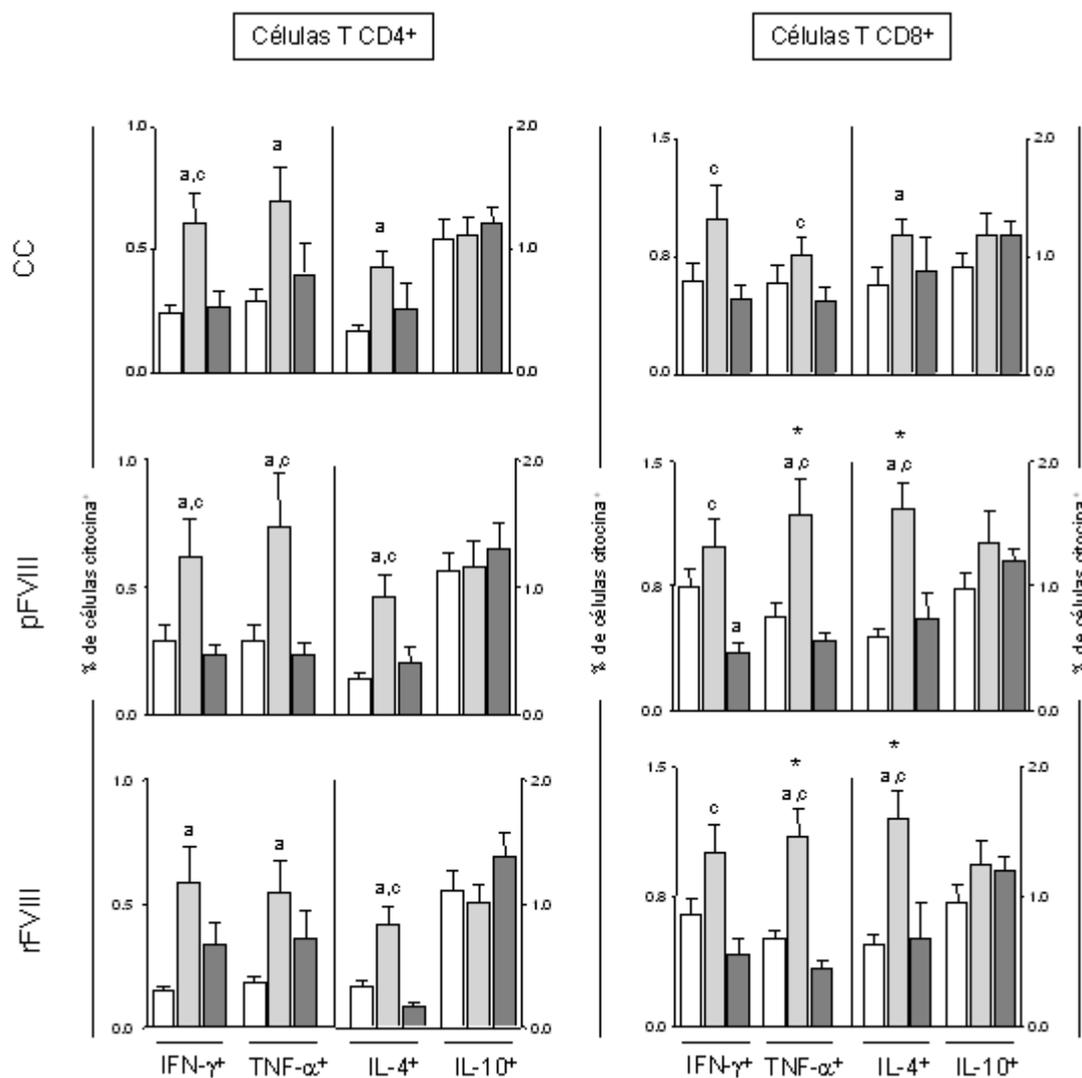
Apesar de os grupos HAα-FVIII(-) e HAα-FVIII(+) apresentarem níveis diminuídos de monócitos IL-10<sup>+</sup>, baixos níveis de monócitos TNF-α<sup>+</sup> observados no grupo HAα-FVIII(+) levou a razão IL-10/TNF-α aumentada em monócitos nesse mesmo grupo. O perfil de citocinas de monócitos apresentou menores níveis de TNF-α no grupo HAα-FVIII(+) quando comparado aos outros grupos testados. Após estímulo com FVIII, todos os grupos apresentaram diminuição significativa de TNF-α. Os resultados

mostraram menores níveis de IL-10 nos dois grupos de pacientes portadores de hemofilia A. Entretanto, após estímulo com FVIII, todos os grupos testados apresentaram aumento significativo nos níveis dessa citocina. Na cultura controle foi verificado alto valor de razão IL-10/TNF- $\alpha$  apenas no grupo HA $\alpha$ -FVIII(+). O estímulo *in vitro* com FVIII levou a uma queda geral na frequência de monócitos TNF- $\alpha^+$  e níveis aumentados de monócitos IL-10 $^+$ . Apesar dessas alterações observadas, nenhuma mudança foi verificada nos valores de razão IL-10/TNF- $\alpha$  dos três grupos testados (Figura 13).



**Figura 13:** Perfil de citocinas de monócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis (barras brancas), HA $\alpha$ -FVIII(-) (barras cinza-claro) e HA $\alpha$ -FVIII(+) (barras cinza-escuro). Dados de cultura controle e estimuladas com FVIII (pdFVIII e rFVIII). Diferenças estatísticas foram representadas pelas letras “a”, “b” e “c” para comparações com os grupos BD, HA $\alpha$ -FVIII(-) e HA $\alpha$ -FVIII(+) respectivamente. Diferenças significativas entre os tipos de cultura dentro de um mesmo grupo foram marcadas com “\*”.

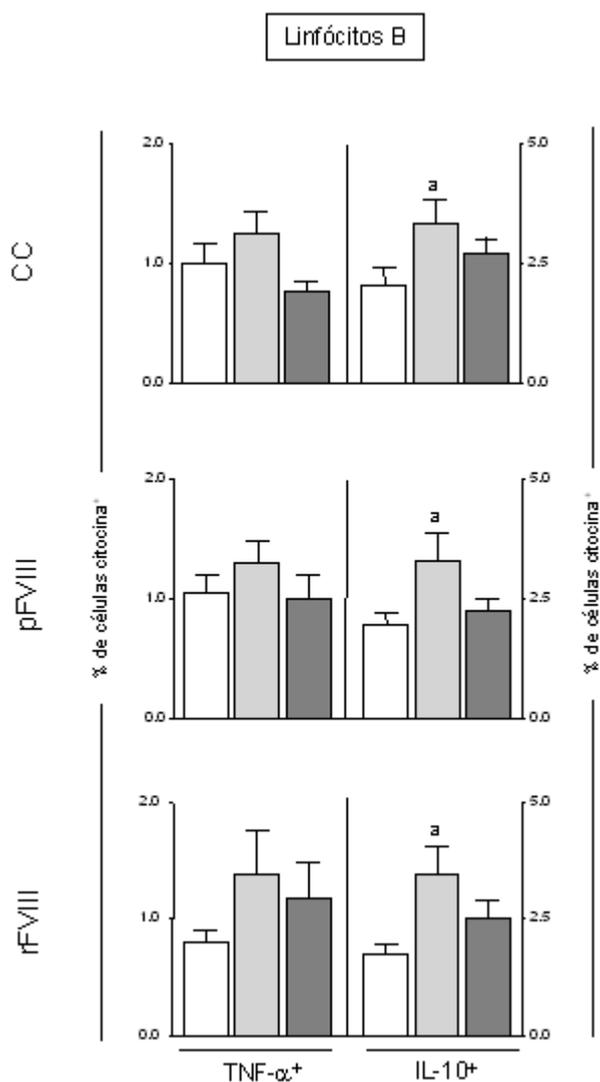
Níveis aumentados de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> e IL-4<sup>+</sup> são seletivamente observados no grupo HA $\alpha$ -FVIII(-). No contexto da resposta imune adaptativa foi verificado que as citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  se encontravam aumentadas nas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no grupo HA $\alpha$ -FVIII(-). Adicionalmente, foram verificados maiores níveis de IL-4 nesse mesmo grupo de pacientes para essa população celular. A estimulação *in vitro* com FVIII teve impacto somente no grupo HA $\alpha$ -FVIII(-) levando a maiores freqüências de células T CD8<sup>+</sup> TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> e IL-4<sup>+</sup>. Entretanto, não pode ser verificada diferenças significativas entre os grupos estudados e os níveis de IL-10 após estímulo com FVIII (Figura 14).



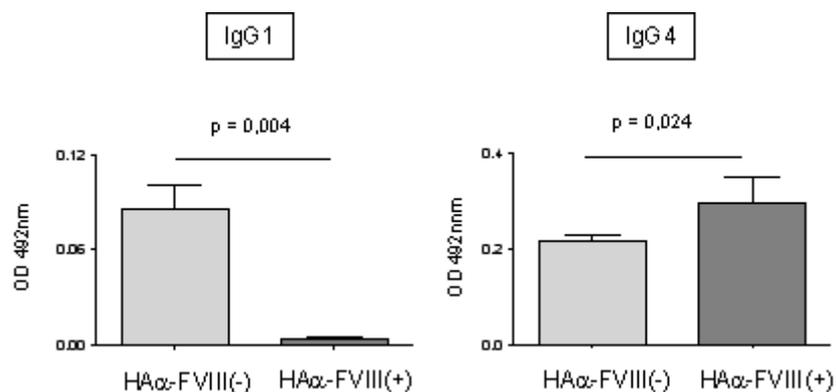
**Figura 14:** Perfil de citocinas de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de sangue periférico de indivíduos saudáveis (barras brancas), HA $\alpha$ -FVIII(-) (barras cinza-claro) e HA $\alpha$ -FVIII(+) (barras cinza-escuro). Dados de cultura controle e estimuladas com FVIII (pdFVIII e rFVIII). Diferenças estatísticas foram representadas pelas letras “a”, “b” e “c” para comparações com os grupos BD, HA $\alpha$ -FVIII(-) e HA $\alpha$ -FVIII(+) respectivamente. Diferenças significativas entre os tipos de cultura dentro de um mesmo grupo foram marcadas com “\*”.

Maior frequência de células B IL-10<sup>+</sup> e maiores níveis de IgG1 anti-FVIII são observados no grupo HA $\alpha$ -FVIII(-), ao passo que níveis basais de células B citocina<sup>+</sup> e maiores níveis de IgG4 anti-FVIII são característicos do grupo HA $\alpha$ -FVIII(+). Analisando o perfil de citocinas das células B foram verificados maiores níveis de IL-10 no grupo HA $\alpha$ -FVIII(-). A estimulação com FVIII não alterou o perfil de IL-10 nos grupos testados. Os níveis de TNF- $\alpha$  nas células B, por sua vez, não apresentaram diferenças entre os grupos (Figura 15). As classes de anticorpos IgG1 e IgG4 apresentam diferenças quantitativas nos dois grupos de pacientes portadores de

hemofilia: predominância de anticorpos IgG4 no grupo HA $\alpha$ -FVIII(+) e maior frequência de anticorpos IgG1 anti-FVIII (Figura 16).



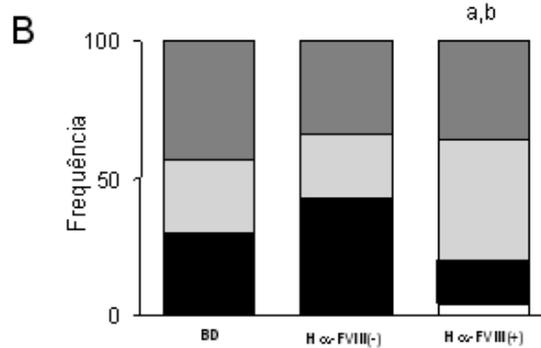
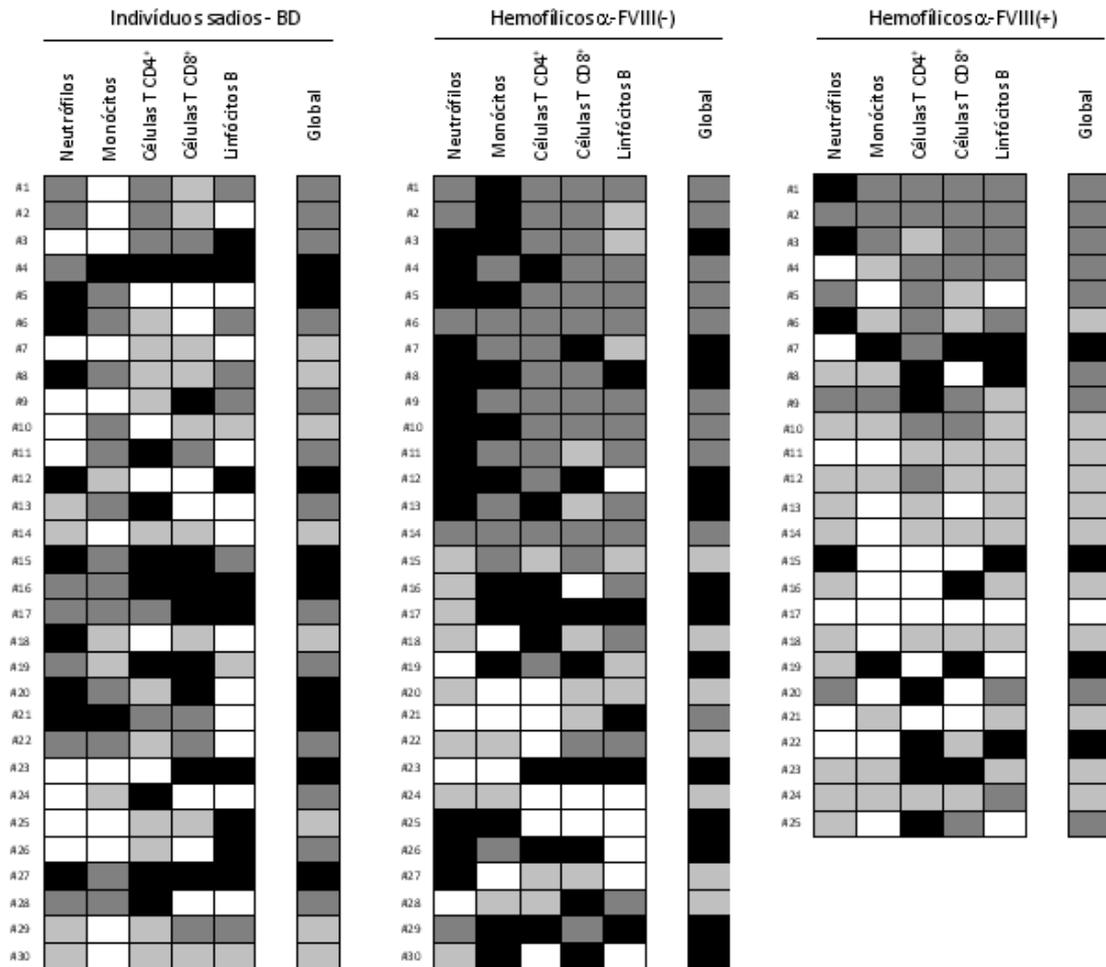
**Figure 15:** Porcentagem de células B TNF- $\alpha^+$  e IL-10 $^+$  de sangue periférico de indivíduos saudáveis (barras brancas), HA $\alpha$ -FVIII(-) (barras cinza-claro) e HA $\alpha$ -FVIII(+) (barras cinza-escuro). Dados da cultura controle (CC) e estimuladas com FVIII (pdFVIII e rFVIII). Resultados estatisticamente significativos foram representados pela letra “a” para comparações com o grupo BD.



**Figura 16:** Detecção por ELISA de anticorpos anti-FVIII IgG1 e IgG4 em amostras de plasma dos grupos HA $\alpha$ -FVIII(-) (barras cinza-escuro) e HA $\alpha$ -FVIII(+) (barras cinza-claro).

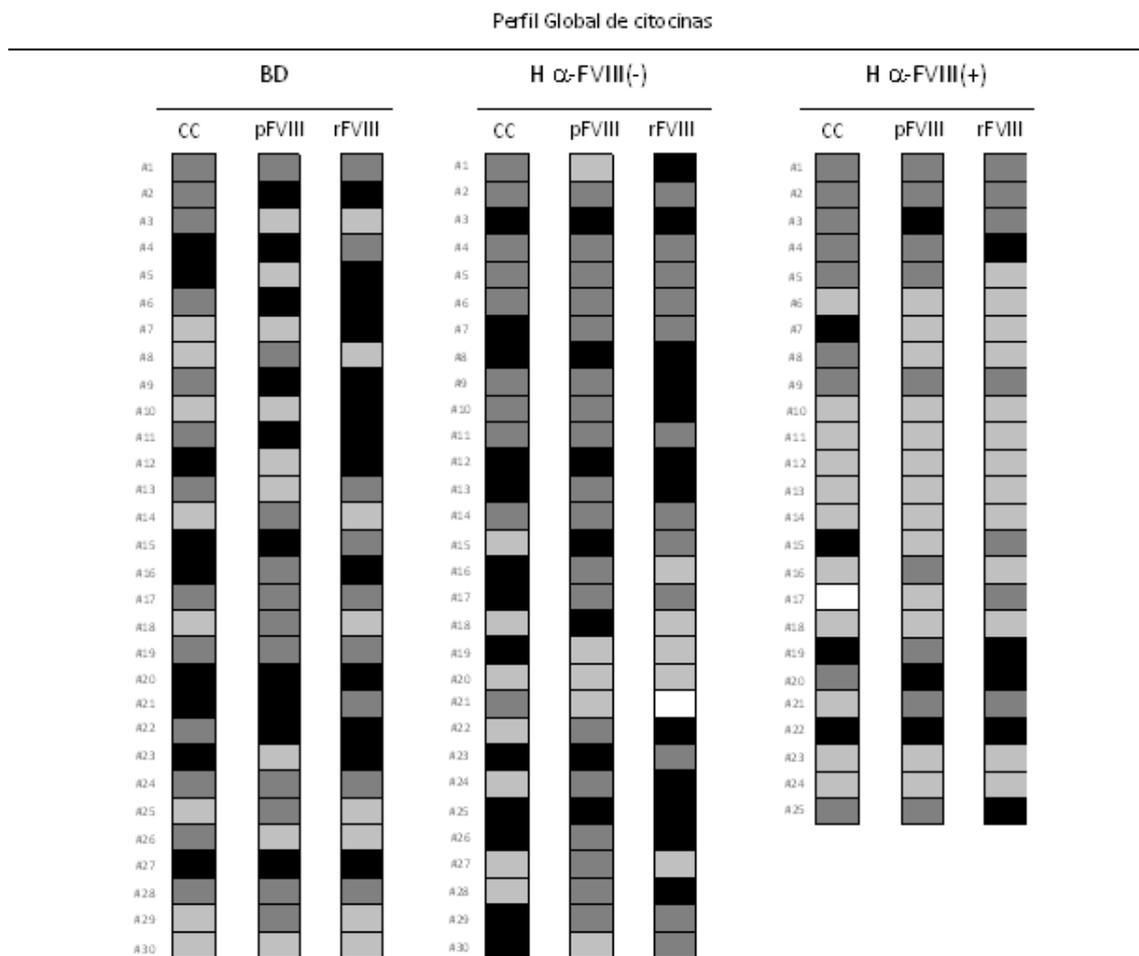
O perfil global de citocinas em leucócitos do sangue periférico demonstrou predominância de um padrão regulador no grupo HA $\alpha$ -FVIII(+). Após a combinação dos resultados obtidos a partir da análise de populações celulares foi observado que indivíduos do grupo HA $\alpha$ -FVIII(+) possuem maior expressão de citocinas reguladoras (IL-4, IL-5 e IL-10). Essa expressão foi significativamente maior nesses pacientes quando comparados aos pacientes do grupo HA $\alpha$ -FVIII(-). Esse resultado não pode ser observado quando aquele grupo foi comparado ao dos indivíduos saios (BD). O grupo HA $\alpha$ -FVIII(-) mostrou predominância de um perfil pró-inflamatório e o grupo BD apresentou um perfil de citocinas considerado misto. Após as análises foi verificado que apenas o paciente #17 do grupo HA $\alpha$ -FVIII(-) apresentou perfil de síntese de citocinas não polarizado (Figura 17).

A

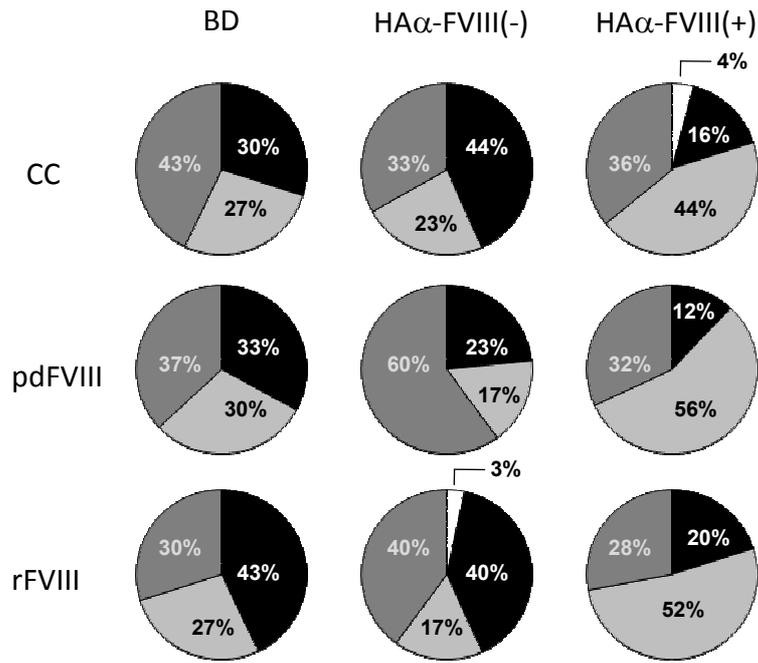


**Figura 17:** (A) Perfil de citocinas em cultura controle representado em diagrama de cores: baixa produção de citocina (□); produção de citocinas pró-inflamatórias (■); produção de citocinas reguladoras (▒); perfil misto de produção de (▓). (B) Padrões de produção de citocinas dos grupos BD, HA $\alpha$ -FVIII(-) e HA $\alpha$ -FVIII(+). Resultados significativos foram representados pelas letras “a” e “b” para comparações entre os grupos BD e HA $\alpha$ -FVIII(-), respectivamente.

O estímulo *in vitro* com pdFVIII ou rFVIII confirmou o padrão de citocinas reguladoras no grupo HA $\alpha$ -FVIII(+). Após a estimulação com FVIII pode-se verificar que os perfis de produção de citocinas encontrados nas culturas controle (CC) não sofreram alterações significativas. Os resultados confirmaram a predominância de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) no grupo HA $\alpha$ -FVIII(-) e de citocinas reguladoras no grupo HA $\alpha$ -FVIII(+). O grupo BD mais uma vez apresentou um perfil misto de citocinas. Confirmando os resultados obtidos anteriormente, o estímulo com pdFVIII ou rFVIII não alteraram os perfis de citocinas dos grupos estudados (Figuras 18 e 19).



**Figura 18:** Perfil de citocinas em culturas controle e estimuladas com FVIII (pdFVIII e rFVIII) representado determinado pela combinação de perfis celulares individuais dos grupos BD, HA $\alpha$ -FVIII(-) e HA $\alpha$ -FVIII(+).



**Figura 19:** Freqüência de produção de citocinas nos grupos BD, HA $\alpha$ -FVIII(-) e HA $\alpha$ -FVIII(+) em culturas controle e estimuladas com FVIII (pdFVIII e rFVIII).

## **5. DISCUSSÃO**

Após terapia de reposição protéica com FVIII purificado, entre 10% e 40% dos pacientes portadores de hemofilia A desenvolvem anticorpos inibidores que neutralizam a atividade pró-coagulante do FVIII. Essa resposta imunológica é uma complicação importante durante o tratamento dos pacientes portadores de HA e aumenta consideravelmente o seu custo. Vários procedimentos terapêuticos tentam aliviar esse problema, mas não existe um protocolo padrão para o tratamento dos inibidores. Nesse sentido, uma nova estratégia de tratamento seriam peptídeos de baixo peso molecular que mimetizam epitopos da proteína e que têm capacidade de bloquear a atividade dos anticorpos inibidores. Tais peptídeos poderiam ser importantes na formulação de um tratamento baseado em seções de plasmaférese que visa a captura específica de anticorpos anti-FVIII antes da infusão da proteína exógena. Assim, a primeira parte desse estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de peptídeos que mimetizam epitopos da molécula de FVIII de depurar anticorpos anti-FVIII de amostras de plasma de pacientes portadores de HA.

O domínio C2 do FVIII é considerado alvo preferencial dos inibidores e por isso foi escolhido para ter seus possíveis epitopos mimetizados por peptídeos sintéticos. O uso das coordenadas tridimensionais da proteína (PRATT et al., 1999) em um algoritmo preditivo especializado (PEPOP) permitiu o desenho e síntese de dez peptídeos correspondentes a seqüências encontradas na superfície do domínio C2. Vários peptídeos foram ciclizados por formação de ligações dissulfeto para mimetizar regiões de voltas encontradas no domínio. Adicionalmente, um peptídeo foi utilizado para mimetizar a região acídica a1 do FVIII, a qual está associada à ligação de inibidores (RAUT et al., 2003).

Em um primeiro momento, a série de peptídeos sintéticos foi utilizada em ensaios de competição para se verificar a capacidade de bloqueio de anticorpos anti-FVIII presentes no plasma de pacientes portadores de hemofilia A. Foi verificado que os peptídeos foram eficientes no bloqueio desses anticorpos, tendo sua ação máxima obtida quando usados em altas concentrações (100–500µg/mL). Considera-se que os bloqueios encontrados, da ordem de 30-70%, foram bastante relevantes, pois os peptídeos testados representavam mínimas partes de uma grande proteína. Nesse contexto, três peptídeos se mostraram mais reativos: (1) o peptídeo 89, que corresponde a um epitopo linear na

região acídica a1 do FVIII reconhecido por anticorpo monoclonal murino (RAUT et al., 2003). De acordo com dados da literatura, anticorpos bloqueados pelo peptídeo 89 foram encontrados em apenas três amostras de plasma de pacientes, indicando que esse epitopo não é tão freqüente nas respostas imunes contra o FVIII (RAUT et al., 2003). Entretanto, em nossas análises foi verificado que quatro entre as oito amostras testadas apresentaram anticorpos bloqueados por esse peptídeo. As diferenças de reatividade entre peptídeos sintetizados neste trabalho e os peptídeos sintetizados em trabalhos anteriores pode ser explicada por dois motivos principais: diferenças nos protocolos de tratamento dos pacientes quanto ao tipo de FVIII utilizado, o que levaria à síntese de anticorpos com especificidades distintas; diferenças nas seqüências que flanqueiam a região do peptídeo que é reconhecida pelo anticorpo que possam interferir na estrutura desse; (2) o peptídeo 92 foi desenhado para compreender os segmentos 24 (2290FTPVV2294) e 23 (2287QD2288) no domínio C2 identificados pelo PEPOP. Por sua vez, esse epitopo foi reconhecido por anticorpos presentes em cinco das nove amostras de plasma testadas. É importante salientar que o peptídeo 92 compartilha diversos resíduos com o peptídeo P14 descrito por Di Giambattista et al (2007), o qual representa um epitopo neutralizador da atividade do FVIII; (3) o peptídeo cíclico 93 (incluindo o segmento 16, 2249KSLLT2253) corresponde a uma estrutura *hairpin* bem exposta no domínio C2. Esse foi o mais eficiente dos peptídeos testados. Anticorpos presentes em seis das oito amostras de plasma testadas foram bloqueados por esse peptídeo. Esse importante epitopo pode ser encontrado em uma região do domínio C2 que está envolvida na ligação às plaquetas e ao fator de Von Willebrand e é alvo de inibidores presentes em vários pacientes (JACQUEMIN et al., 1998).

Os resultados encontrados neste trabalho mostraram que o perfil de reatividade dos peptídeos testados é diferente em cada paciente. Essa conclusão pode interferir negativamente em algumas pesquisas que têm como objetivo o bloqueio de inibidores de FVIII por peptídeos sintéticos que mimetizam epitopos da proteína (VILLARD et al., 2003; KOPECKY et al., 2005; 2006a,b). A diversidade e a dispersão dos epitopos reconhecidos na superfície do FVIII já haviam sido descritas anteriormente em estudos que utilizaram regiões maiores da proteína (cadeias leve e pesada) (DIMICHELE, 2002). Nossos resultados confirmam essa observação, principalmente quando foram observadas mudanças no perfil de peptídeos reconhecidos durante o tratamento de reposição protéica (amostras S2A e S2B). A produção de anticorpos com

especificidades diferentes poderia ser consequência de mudanças ao longo do tratamento, principalmente quanto ao uso de diferentes tipos de concentrados de FVIII (ORSINI et al., 2005; HODGE et al., 2006).

O presente estudo também avaliou a capacidade de três peptídeos capturarem anticorpos anti-FVIII do plasma de pacientes em um sistema de cromatografia de afinidade. Foi verificado que o acoplamento dos peptídeos via ligação dissulfeto na sua porção C-terminal após a remoção do grupamento Acm à resina *Thiopropyl Sepharose 6B* é uma boa estratégia. A matriz sólida construída foi capaz de reter uma grande proporção dos anticorpos anti-FVIII presentes no plasma dos pacientes e as atividades inibitórias dos anticorpos não retidos não foram alteradas durante o processo. Duas hipóteses podem explicar o resultado obtido: (1) os epitopos definidos neste trabalho não representam regiões de epitopos inibitórios; (2) o teste de Bethesda para detectar diminuição da atividade inibitória dos anticorpos anti-FVIII não é sensível o suficiente para detectar mínimas alterações na atividade inibidora desses anticorpos. Acredita-se que os resultados encontrados neste estudo são preliminares. Para se desenvolver uma estratégia de retirada específica dos anticorpos inibidores de FVIII do plasma de pacientes, é preciso produzir mais peptídeos que mimetizem outros domínios da proteína.

Nos últimos 30 anos, avanços nas pesquisas de imunologia clínica aumentaram o entendimento dos mecanismos que levam ao desenvolvimento de inibidores de FVIII. Vários fatores, incluindo aqueles relacionados à terapia bem como à resposta imune dos pacientes (SINGER et al., 1996; REDING et al., 1999, 2000, 2002; HU et al., 2003, 2007; ASTERMARK et al., 2006a, 2006b) parecem interferir nesse fenômeno. Vários pontos chave têm sido avaliados como fatores preditivos de ativação diferencial de células e síntese de citocinas durante o desenvolvimento de inibidores de FVIII em pacientes portadores de HA: o impacto da mutação no gene de FVIII nas vias de resposta imune (REDING et al., 2006; LEE et al., 2006) e os polimorfismos dos genes de HLA e citocinas (ASTERMARK et al., 2006a, 2006b; HAY et al., 1997; OLDENBURG et al., 1997). Com o objetivo de analisar a função do sistema imune no estabelecimento/manutenção do perfil de inibição do FVIII, foram investigadas variantes genéticas nos genes e nas regiões promotoras de interleucinas e caracterizado

o perfil de citocinas de leucócitos do sangue periférico de pacientes portadores de HA com e sem histórico de desenvolvimento de inibidores.

Neste estudo, foi encontrada associação entre determinados haplótipos de IL-10 e o desenvolvimento de inibidores de FVIII em pacientes portadores de hemofilia A. Os resultados sugerem que a regulação da síntese de IL-10 desempenha um papel importante na formação de uma resposta imune contra o FVIII. IL-10 é uma citocina conhecida por sua importância nas respostas anti-inflamatórias contribuindo para síntese *in vitro* de todos os tipos de imunoglobulinas por células B (ROSADO *et al.*, 2008). Adicionalmente, a região promotora do gene de IL-10 possui três polimorfismos que estão associados com baixas e altas taxas de síntese dessa citocina (-1082 G/A; -819 T/C; -592 A/C). O alelo -1082 G é especificamente associado com alta síntese de IL-10 e o alelo -1082 A com baixa produção dessa citocina. Finalmente, o haplótipo GCC é relacionado a alta síntese de IL-10, o haplótipo ACC a uma produção intermediária e o haplótipo ATA a uma baixa produção dessa citocina (SCASSELLATI *et al.*, 2004).

Os resultados encontrados neste estudo mostraram que há associação entre a presença de diferentes haplótipos e o aparecimento de inibidores de FVIII nos pacientes portadores de HA. As análises baseadas nos grupos definidos como “GCC” e “não GCC” propostas por Wergeland *et al.* (2005) não mostraram resultados significativos. Entretanto, a divisão desses grupos em três outros mostrou um resultado importante. A associação do haplótipo GCC com outros haplótipos que definem síntese intermediária ou baixa de IL-10 pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento de inibidores de FVIII. As análises mostraram que pacientes com combinação de haplótipos que conferem alta e intermediária síntese de IL-10 (GCC/ACC) têm 5,8 vezes mais chance de apresentar inibidores de FVIII. Em contrapartida, pacientes com a combinação de alta e baixa síntese de IL-10 (GCC/ATA) tem 3,5 vezes mais chance de não desenvolver inibidores de FVIII. Finalmente, não foi encontrada diferença significativa quando foram analisados os dados dos pacientes homocigotos para o haplótipo GCC.

Esses resultados mostraram que uma simples correlação considerando apenas a presença ou ausência de um determinado haplótipo não é suficiente. Análises genóticas, como análise de microsátélites no gene de IL-10, têm sido considerados nas análises de

associação ao desenvolvimento de inibidores de FVIII (ASTERMARK *et al.*, 2006a). Por isso, é interessante considerar a presença de outros marcadores genéticos que podem interferir no controle da síntese de citocinas e modular as respostas imunes ao FVIII.

O genótipo AA (-308) do gene de TNF- $\alpha$  A/A tem sido associado ao desenvolvimento de inibidores do FVIII em grupos de pacientes predominantemente caucasianos (ASTERMARK *et al.*, 2006b). Em nossas análises, indivíduos com esse genótipo não foram encontrados. A população brasileira tem alto grau de miscigenação, o que pode causar diferenças na distribuição genotípica entre o grupo estudado e os grupos de pacientes predominantemente caucasianos que participam de estudos principalmente nos Estados Unidos e Europa.

No contexto das análises genéticas dos genes envolvidos na resposta imune contra o FVIII, a questão dos polimorfismos é apenas um ramo de um complexo esquema que leva à formação de inibidores. O tipo de tratamento utilizado (proteínas recombinantes ou purificadas de plasma), o tipo de resposta imune mediada nesses casos e o tipo de mutação no gene do FVIII devem ser considerados. Quando todas essas variáveis puderem ser associadas possivelmente poderemos estabelecer parâmetros para determinar a real chance e os eventos que levam a uma resposta imune contra o FVIII exógeno em apenas alguns indivíduos que se submetem a tratamento de reposição protéica.

As análises referentes ao perfil de citocinas de leucócitos do sangue periférico mostraram predominância de resposta imune anti-inflamatória/reguladora nas células da imunidade inata dos pacientes HA $\alpha$ -FVIII(+): a razão IL-5/TNF- $\alpha$  em neutrófilos e IL-10/TNF- $\alpha$  em monócitos mostraram valores aumentados. Apesar do aumento de monócitos IL-10<sup>+</sup> após estímulo *in vitro* com FVIII em todos os grupos, a predominância de um perfil anti-inflamatório/regulador foi mantida exclusivamente no grupo HA $\alpha$ -FVIII(+). Esses resultados enfatizam que o perfil de citocinas anti-inflamatórias/reguladoras nas células da imunidade inata é de alguma forma relacionada ao desenvolvimento/manutenção dos inibidores de FVIII.

É importante salientar que o perfil global de citocinas anti-inflamatórias/reguladoras observado no grupo HA $\alpha$ -FVIII(+) não sofreu alterações mesmo depois da estimulação *in vitro* com pdFVIII ou rFVIII. Análises adicionais envolvendo as células do sistema imune adaptativo demonstraram que o grupo HA $\alpha$ -FVIII(+) apresentou níveis basais de células citocinas<sup>+</sup> em seus linfócitos T e B, quando comparado aos resultados encontrados para o grupo de referência BD. Esse microambiente independente de citocinas das células T pode favorecer a ativação das células B levando à síntese de IgG4. A estrutura altamente glicosilada do FVIII pode favorecer essa ativação de linfócitos B mesmo na ausência de co-estimulação por células T. Alguns modelos de ativação de linfócitos B foram propostos por Bretcher e Cohn (1970). Essas propostas derivam da premissa de que somente o reconhecimento do antígeno é insuficiente para estimular células B *naïve*, pois isto poderia induzir respostas autoreativas. Por outro lado, a interação das células T e B nesse contexto levaria a ativação completa dos linfócitos B. Evidências recentes têm sugerido que a ativação de linfócitos B independente das citocinas de células T é parte da resposta imune humoral. Dessa forma, o antígeno sozinho ou o antígeno acrescido de sinais celulares, exceto de células T, podem induzir uma resposta de linfócitos B.

Baseando-se nesses resultados, nossa hipótese é que o microambiente predominantemente anti-inflamatório/regulador determinado por neutrófilos e monócitos, acrescido de níveis basais de citocinas produzidas por linfócitos T e B pode favorecer a síntese de anticorpos IgG4 anti-FVIII com atividade inibidora. Estudos anteriores têm sugerido a relevância da resposta imune anti-inflamatória/reguladora induzida por células T CD4<sup>+</sup> na síntese de inibidores de FVIII (HU et al., 2007; REDING et al., 2002). Na verdade, tem-se sugerido que um padrão de citocinas pró-inflamatórias pode ser importante no início da resposta imune anti-FVIII e que uma mudança desse perfil para um perfil anti-inflamatório/regulador em células T CD4<sup>+</sup> pode representar o ponto crucial para uma produção robusta de inibidores (HU et al., 2007). Nossos dados sugerem que a manutenção da produção de inibidores de FVIII nos pacientes testados é dependente de um padrão de citocinas anti-inflamatórias/reguladoras, mas não conta com uma resposta relevante de células T. É possível que diferenças nas metodologias adotadas em nosso estudo, como a utilização de amostras de sangue total e plasma autólogo nas culturas para mimetizar o microambiente encontrado *in vivo*, tenham revelado esse fenômeno que não havia sido

relatado anteriormente em trabalhos que utilizaram PBMCs isolados, clones de células T CD4<sup>+</sup> e ausência de plasmas autólogos (REDING et al., 1999; HODGE & HAN, 2001; TOWFIGHI et al., 2006; HU et al., 2007).

Por outro lado, as análises das células da imunidade inata do grupo HA $\alpha$ -FVIII(-) revelaram que apesar dos níveis basais de citocinas observados em neutrófilos, esses pacientes apresentaram níveis aumentados de monócitos TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>, o que levou a valores baixos de razão IL-5/TNF- $\alpha$ , sugerindo uma predominância de um perfil imune pró-inflamatório. Adicionalmente, as análises da imunidade adaptativa revelaram que o grupo HA $\alpha$ -FVIII(-) apresentou perfil de citocinas pró-inflamatório modulado representado por maiores níveis de células T IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> juntamente com elevados níveis de células T IL-4<sup>+</sup> nos subtipos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Os dados também demonstraram que esse perfil de citocinas pró-inflamatório modulado foi mantido após estímulo *in vitro* com FVIII, como evidenciado pelo aumento na síntese de TNF- $\alpha$  e IL-4<sup>+</sup> por células T CD8<sup>+</sup> seletivamente observado no grupo HA $\alpha$ -FVIII(-). Resultados similares foram observados por Ettinger et al. (2009): foi demonstrado que todos os clones de células T de um paciente sem inibidores de FVIII, apesar de possuírem a capacidade de produzir IL-4, mantinham uma predominância de resposta imune pró-inflamatória caracterizada por altos níveis de IFN- $\gamma$ . Análises adicionais de nossos dados demonstraram um perfil imune modulado por IL-10 em linfócitos B e maiores níveis de anticorpos anti-FVIII IgG1 sem funções inibidoras aparentes são observados no grupo HA $\alpha$ -FVIII(-). Estudos anteriores têm sugerido que a secreção de anticorpos IgG1 é dependente da síntese de IL-10 por linfócitos B (BRIÉRE et al., 1994). As análises do perfil global de citocinas revelaram que os leucócitos do sangue periférico dos pacientes do grupo HA $\alpha$ -FVIII(-) apresentam um padrão misto de citocinas na presença do estímulo *in vitro* com pdFVIII. Entretanto, uma predominância de resposta imune pró-inflamatória na presença de rFVIII é observada nesse grupo de pacientes. Resultados similares são observados no grupo referência BD, mas no grupo HA $\alpha$ -FVIII(+) um padrão anti-inflamatório/regulador é observado. Esse resultado confirma os dados obtidos das análises compartimentadas de células. Baseados nesses resultados, acreditamos que a resposta imune pró-inflamatória modulada determinada por maiores sínteses de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  por células T, controlada por elevados níveis de células T IL-4<sup>+</sup> e linfócitos B IL-10<sup>+</sup> pode favorecer a síntese de anticorpos anti-FVIII IgG1,

evitando o desenvolvimento de anticorpos IgG4 inibidores de FVIII. Provavelmente os pacientes do grupo HA $\alpha$ -FVIII(-) controlam o desenvolvimento de inibidores IgG4 de FVIII utilizando duas vias: 1) modulação da resposta imune pró-inflamatória pelo recrutamento de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> IL-4<sup>+</sup> e 2) aumento da produção de IL-10 por linfócitos B favorecendo a síntese de anticorpos IgG1 anti-FVIII de uma maneira dependente de células T. A produção de IgG1 mediada por citocinas pró-inflamatórias derivadas da estimulação de células T é também bem estabelecida (ABBAS et al., 1996).

De acordo com nossa hipótese, durante a fase inicial do tratamento com infusões de FVIII, ocorre uma resposta pró-inflamatória mediada por células T que leva à síntese de anticorpos IgG1 anti-FVIII sem atividade inibitória. Após repetidas exposições ao FVIII, com maiores frequências em pacientes gravemente afetados pela HA, uma mudança para um padrão de citocinas anti-inflamatórias/reguladoras independente das citocinas de células T pode ocorrer e favorecer a mudança de sub-classe para anticorpos IgG4 inibidores de FVIII. É possível que protocolos imunoterápicos possam ser implementados no início do tratamento com FVIII para manter a dependência de células T na resposta imune e evitar a mudança para uma resposta anti-inflamatória/reguladora independente das citocinas de células T que favorece a produção de inibidores de FVIII. Dessa forma, poderíamos aumentar a qualidade de vida e o sucesso do tratamento dos pacientes portadores de HA. Uma importante linha de pesquisa a ser considerada em investigações futuras é a cinética da conversão de uma resposta imune pró-inflamatória para anti-inflamatória/reguladora durante o tratamento desses pacientes. É possível que a manutenção de uma resposta imune mediada por células T com perfil pró-inflamatório modulado possa ser a chave para evitar o desenvolvimento de anticorpos IgG4 inibidores de FVIII. Nesse contexto, é também relevante definir o papel de células T e B reguladoras no controle da resposta imune anti-FVIII em pacientes que não desenvolvem inibidores de FVIII e em indivíduos saudáveis. Por fim, espera-se que a compilação desses dados possa permitir a definição de possíveis candidatos a ser representantes do grupo HA $\alpha$ -FVIII(+), o que poderá aumentar a qualidade de vida e a eficiência no tratamento desses pacientes.

## **6. CONCLUSÕES**

1. Os peptídeos sintetizados foram capazes de neutralizar a ligação dos anticorpos inibidores ao FVIII.
2. Os peptídeos 89, 92 e 93, quando ligados a uma matriz sólida, são capazes de reter quantidades significativas de inibidores do FVIII encontrados no plasma de pacientes HA.
3. O perfil de reatividade dos peptídeos testados é diferente para cada paciente.
4. Os inibidores presentes no plasma dos pacientes podem ter especificidades diferentes em momentos distintos do tratamento de reposição protéica.
5. Indivíduos com a combinação de alta e intermediária síntese de IL-10 (GCC/ACC) têm 5,8 vezes mais chances de desenvolver inibidores de FVIII.
6. Indivíduos com a combinação de alta e baixa síntese de IL-10 (GCC/ATA) têm 3,5 vezes mais chances de não desenvolver inibidores de FVIII.
7. Os pacientes HA $\alpha$ -FVIII(+) apresentam predominância de resposta imune anti-inflamatória/reguladora nas células da imunidade inata.
8. O grupo HA $\alpha$ -FVIII(+) apresenta níveis basais de células citocinas<sup>+</sup> em seus linfócitos T e B.
9. O grupo HA $\alpha$ -FVIII(-) apresenta predominância de perfil pró-inflamatório em células das respostas imunes inata e adaptativa.
10. Existe um microambiente de citocinas totais pró-inflamatórias em pacientes HA $\alpha$ -FVIII(-) e anti-inflamatórias/reguladoras em pacientes HA $\alpha$ -FVIII(+).

## **7. PERSPECTIVAS**

A partir dos resultados positivos obtidos no estudo de peptídeos sintéticos que bloqueiam a ligação dos inibidores ao FVIII, tem-se como perspectiva aprimorar as análises imunológicas do desenvolvimento de inibidores. Pretende-se estimular e expandir células T CD4<sup>+</sup> específicas anti-FVIII através do desafio *in vitro* com os peptídeos ligados a tetrâmeros de HLA. Adicionalmente, serão realizados testes de ativação de linfócitos B utilizando FVIII puro de um modo independente das citocinas de células T. Os resultados alcançados poderão confirmar ou refutar a hipótese de que os pacientes que desenvolvem inibidores têm seus linfócitos B estimulados diretamente pela proteína infundida, independentemente da estimulação por citocinas das células T CD4<sup>+</sup>.

Tendo em vista os resultados obtidos a partir das análises de citocinas intracitoplasmáticas, tem-se como perspectiva, analisar o padrão de citocinas plasmáticas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10) em amostras de pacientes portadores de HA categorizados pela presença (baixo e alto título) ou ausência de inibidor de FVIII. As dosagens, realizadas por citometria de fluxo, deverão ser realizadas antes e 24 horas após a incubação de sangue total *in vitro* com FVIII puro. Essas análises têm o objetivo de confirmar os resultados até aqui alcançados, pois pode reforçar a idéia de pacientes que desenvolvem inibidores de FVIII têm maior síntese de citocinas anti-inflamatórias/reguladoras, principalmente IL-10. Adicionalmente, pretende-se reforçar o achado de que a presença do FVIII não altera o perfil de citocinas sintetizadas.

Quanto ao perfil imunológico dos pacientes portadores de HA, pretende-se analisar o perfil de células do sistema imune do sangue periférico desses indivíduos no contexto *ex vivo*. Hipotetiza-se que proporções distintas de células T e B, neutrófilos, monócitos e células NK podem ser encontradas nos dois grupos de pacientes definidos: com e sem inibidores de FVIII. Realizar essa caracterização é importante para a definição de grupos de risco para o desenvolvimento de inibidores. Ademais, pretende-se definir a proporção de células T e B reguladoras no sangue periférico de pacientes portadores de hemofilia A com e sem inibidores de FVIII. O estudo do papel dessas células é de fundamental importância para se tentar explicar porque apenas alguns indivíduos desenvolvem uma resposta imune contra o FVIII exógeno.

Nos últimos anos, tem sido implementada uma terapia alternativa que visa minimizar os efeitos deletérios dos inibidores de FVIII. A metodologia consiste em tratar os pacientes com anticorpos monoclonais anti-CD20 que depletam os linfócitos B, impedindo a ativação dessas células e a síntese de inibidores. Entretanto, muitos efeitos colaterais têm sido relatados, pois o tratamento pode alterar significativamente o balanço do sistema imune dos pacientes. Os efeitos dessa terapia associada ao tratamento com FVIII nas células do sistema imune não são bem definidos. Poderão ser analisados o perfil celular e a síntese de citocinas em cultura de sangue total de curta duração estimulada com anticorpo monoclonal anti-CD20. Os resultados poderão mostrar alterações nas populações celulares que são responsáveis pelos efeitos adversos relatados durante o tratamento dos pacientes. Dessa forma, os dados podem ser utilizados como base de aprimoramentos em tratamentos futuros.

## **8. REFERÊNCIAS**

1. ABBAS, A.; MURPHY, K.; SHER, A. Functional diversity of helper T cell lymphocytes. **Nature**, v.383, p.787-793, 1996.
2. ALGIMAN, M.; DIETRICH, G.; NYDEGGER, U.E.; BOIELDIEU, D.; SULTAN, Y.; KAZATCHKINE, M.D. Natural antibodies to factor VIII (antihemophilic factor) in healthy individuals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.89, p.3795-3799, 1992.
3. ALY, A.M.; ALEDORT, L.M.; LEE, T.D.; HOYER, L.W. Histocompatibility antigen patterns in haemophilic patients with factor VIII antibodies. **British Journal of Haematology**, v.76, p.238-241, 1990.
4. ANTONARAKIS, S.E.; ROSSITER, J.P.; YOUNG, M.; HORST, J.; DE MOERLOOSE, P.; SOMMER, S.S.; KETTERLING, R.P.; KAZAZIAN, H.H.; NÉGRIER, C.; VINCIGUERRA, C.; GITSCHIER, J.; GOOSSENS, M.; GIRODON, E.; GHANEM, N.; PLASSA, F.; LAVERGNE, J.M.; VIDAUD, M.; COSTA, J.M.; LAURIAN, Y.; LIN, S.W.; LIN, S.R.; SHEN, M.C.; LILLICRAP, D.; TAYLOR, S.A.; WINDSOR, S.; VALLEIX, S.V.; NAFA, K.; SULTAN, Y.; DELPECH, M.; VNENCAK-JONES, C.L.; PHILLIPS, J.A.; LJUNG, R.C.; KOUMBARELIS, E.; GIALERAKI, A.; MANDALAKI, T.; JENKINS, P.V.; COLLINS, P.W.; PASI, K.J.; GOODEVE, A.; PEAKE, I.; PRESTON, F.E.; SCHWARTZ, M.; SCHEIBEL, E.; INGERSLEV, J.; COOPER, D.N.; MILLAR, D.S.; KAKKAR, V.V.; GIANNELLI, F.; NAYLOR, J.A.; TIZZANO, E.F.; BAIGET, M.; DOMENECH, M.; ALTISENT, C.; TUSELL, J.; BENEYTO, M.; LORENZO, J.I.; GAUCHER, C.; MAZURIER, C.; PEERLINCK, K.; MATTHIJS, G.; CASSIMAN, J.J.; VERMYLEN, J.; MORI, P.G.; ACQUILA, M.; CAPRINO, D.; INABA, H. Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study. **Blood**. v.86, p.2206-2212, 1995.
5. ARAI, M.; SCANDELLA, D.; HOYER, L.W. Molecular basis of factor VIII inhibition by human antibodies: antibodies that bind to the factor VIII light chain prevent the interaction of factor VIII with phospholipid. **The Journal of Clinical Investigation**, v.83, p.1978-1984, 1989.

6. ASHWELL, G.; HARFORD, J. Carbohydrate-specific receptors of the liver. **Annual Review in Biochemistry**, v.51, p.531-554, 1982.
7. ASTERMARK, J., OLDENBURG, J., CARLSON, J., PAVLOVA, A., KAVAKLI, K., BERNTORP, E.; LEFVERT, A.K. Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. **Blood**, v.108, p.3739-3745, 2006a.
8. ASTERMARK, J., OLDENBURG, J., PAVLOVA, A., BERNTORP, E. & LEFVERT, A.K.; 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**, v.107, p.3167-3172, 2006b.
9. AWAD, M.R.; WEBBER, S.; BOYLE, G., STURCHIOC, C.; AHMED, M.; MARTELL, J.; LAW, Y.; MILLER, S.A.; BOWMAN, P.; GRIBAR, S.; PIGULA, F.; MAZARIEGOS, G.; GRIFFITH, B.P. & ZEEVI, A. The effect of cytokine gene polymorphisms on pediatric heart allograft outcome. **The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society of Heart Transplantation**, v.20, p.625-630, 2001.
10. AZIZ, T.; HASLETON, P.; HANN, A.W.; YONAN, N.; DEIRANIYA, A. & HUTCHINSON, I.V. Transforming growth factor beta in relation to cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v.119, p.700–708, 2000.
11. BARROW, R.T.; HEALEY, J.F.; GAILANI, D.; SCANDELLA, D.; LOLLAR, P. Reduction of the antigenicity of factor VIII toward complex inhibitory antibody plasmas using multiply-substituted hybrid human/porcine factor VIII molecules. **Blood**, v.95, p.564-568, 2000.
12. BARROW, R.T.; HEALEY, J.F.; JACQUEMIN, M.G.; SAINT-REMY, J.M.; LOLLAR, P. Antigenicity of putative phospholipid membrane-binding residues in factor VIII. **Blood**, v.97, p.169-174, 2001.

13. BATHGATE, A.J.; PRAVICA, V.; PERREY, C.; HAYES, P.C.; HUTCHINSON, I.V. The effect of polymorphisms in tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, and transforming growth factor-beta1 genes in acute hepatic allograft rejection. **Transplantation**, v.69, p.1514–1517, 2000.
14. BAYRY, J.; LACROIX-DESMAZES, S.; PASHOV, A.; STAHL, D.; HOEBEKE, J.; KAZATCHKINE, M.D.; KAVERI, S.V. Autoantibodies to factor VIII with catalytic activity. **Autoimmunity Reviews**, v.2, p.30-35, 2003.
15. BEHRMANN, M.; PASI, J.; SAINT-REMY, J.M.; KOTITSCHKE, R.; KLOFT, M. Von Willebrand factor modulates factor VIII immunogenicity: comparative study of different factor VIII concentrates in a haemophilia A mouse model. **Thrombosis and Haemostasis**, v.88, p.221-229, 2002.
16. BIDWELL, J.; KEEN, L.; GALLAGHER, G.; KIMBERLY, R.; HUIZINGA, T.; MCDERMOTT, M.F.; OKSENBERG, J.; MCNICHOLL, J.; POCIOT, F.; HARDT, C.; D'ALFONSO, S. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. **Genes and Immunity**, v.1, p.3-19, 1999.
17. BOISSON-VIDAL, C.; HAOUAM, M.; LAKHIARI, H.; HUGUET, H.; DAHRI, L.; SULTAN, Y.; JOZEFONVICZ, J.; SIALI, R. Polystyrene derivatives as candidates for extracorporeal adsorption of factor VIII antibodies in the management of haemophiliac patients. **Vox Sanguinis**, v.83, p.214-221, 2002.
18. BOVENSCHEN, N.; RIJKEN, D.C.; HAVEKES, L.M.; VAN VLIJMEN, B.J.M.; MERTENS, K. The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.3, p.1257-1265, 2005.
19. BRAUN, N.; BOSCH, T. Immunoabsorption, current status and future developments. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v.9, p.2017-2038, 2000.

20. BRETCHER, P.; COHN, M. A theory of self-nonsel self discrimination. **Science**, v.169, p.1040-1049, 1970.
21. BRIÈRE, F.; SERVET-DELPRAT, C.; BRIDON, J.M.; SAINT-REMY, J.M.; BANCHEREAU, J. Human interleukin 10 induces naive surface immunoglobulin D+ (slgD) B cells to secrete IgG1 and IgG3. **The Journal of Experimental Medicine**, v.179, p.757-762, 1994.
22. CHAVES, D.G.; VELLOSO-RODRIGUES, C.; MOREAU, V.; NGUYEN, C.; VILLARD, S.; BELISÁRIO, A.R.; GRANIER, C.; SANTORO, M.M. Reactivity profile of anti-factor VIII antibodies with designed synthetic peptides mimicking epitopes of the C2 and a1 domains. **British Journal of Haematology**, v.141, p.708-715, 2008.
23. DI GIAMBATTISTA, M.; BRANCKAERT, T.; HOUGARDY, V.; KEMBALL-COOK, G.; LAUB, R. In silico prediction of FVIII epitopes recognised by natural autoantibodies in polyvalent immunoglobulin concentrates. **Molecular Immunology**, v.44, p.1903-1913, 2007.
24. DI GIAMBATTISTA, M.; BRANCKAERT, T.; LAUB, R. Mapping of natural anti-FVIII antibodies in plasma pools from healthy donors: use of rationally designed synthetic peptides. **Biologicals**, v.29, p.229-232, 2001.
25. DIMICHELE, D. M. Inhibitors in haemophilia: a primer. **Haemophilia**. v.6, p.38-40, 2000.
26. DIMICHELE, D.M. Inhibitors: resolving diagnostic and therapeutic dilemmas. **Haemophilia**, v.8, p.280-287, 2002.
27. EHRENFORTH, S.; KREUZ, W.; SCHARRER, I.; LINDE, R.; FUNK, M.; GUNGOR, T.; KRACKHARDT, B.; KORNHUBER, B. Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs. **Lancet**, v.339, p.594-598, 1992.

28. ESKDALE, J.; WORDSWORTH, P.; BOWMAN, S.; FIELD, M. & GALLAGHER, G. Association between polymorphisms at the human IL-10 locus and systemic lupus erythematosus. **Tissue Antigens**, v.49, p.635-639, 1997.
29. ETTINGER, R.A.; JAMES, E.A.; KWOK, W.W.; THOMPSON, A.R.; PRATT, K.P. Lineages of human T-cell clones, including T helper 17/T helper 1 cells, isolated at different stages of anti-factor VIII immune responses. **Blood**, v.114, p.1423-1428, 2009.
30. FELSENSTEIN, J. PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.2). **Cladistics**, v.5, p.164–166, 1989.
31. FIJNVANDRAAT, K.; BRIL, W.S.; VOORBERG, J. Immunobiology of inhibitor development in hemophilia A. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**. v.29, p.61-68, 2003.
32. FISHMAN, D.; FAULDS, G.; JEFFERY, R.; MOHAMED-ALI, V.; YUDKIN, J.S.; HUMPHREIS, S & WOO, P. The effect of novel polymorphism in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.102, p.1369-1376, 1998.
33. FOSTER, P.A.; FULCHER, C.A.; HUOGHTEN, R.A.; DE GRAAF MAHONEY, S.; ZIMMERMAN, T.S. Localization of the binding regions of a murine monoclonal anti-FVIII antibody and a human anti-factor VIII alloantibody, both of which inhibit factor VIII procoagulant activity, to amino acid residues threonine351, serine365 of the factor VIII heavy chain. **The Journal of Clinical Investigation**, v.82, p.123-128, 1988.
34. FREIDIN, M.B.; KOPYAKOVA, O.S.; OGORODOVA, L.M. & PUZYREV, V.P. Association of polymorphisms in the human IL4 and IL5 genes with atopic bronchial asthma and severity of the disease. **Comparative and Functional Genomics**, v.4, p.346-350, 2003.

35. FULCHER, C.; DE GRAAF MAHONEY, S.; ZIMMERMAN, T. Factor VIII inhibitor IgG subclass and fVIII polypeptide specificity determined by immunoblotting. **Blood**, v.69, p.1475-1480, 1987.
36. FULCHER, C.A.; DE GRAAF MAHONEY, S.; ROBERTS, J.R.; KASPER, C.K.; ZIMMERMAN, T.S. Localization of human factor VIII inhibitor epitopes to two polypeptide fragments. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.82, p.7728-7732, 1985.
37. GAUSEPOHL, H.; BOULIN, C.; KRAFT, M; FRANK, R.W. Automated multiple peptide synthesis. **Peptide Research**, v.5, p.91-94, 1992.
38. GEYSEN, H.M.; RODDA, S.J.; MASON, T.J. A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. **Molecular Immunology**, v.23, p.709-715, 1986.
39. GILLES, J.G.; ARNOUT, J.; VERMYLEN, J.; SAINT-REMY, J.M. Anti-factor VIII antibodies of hemophiliac patients are frequently directed towards nonfunctional determinants and do not exhibit isotypic restriction. **Blood**, v.82, p.2452-2461, 1993.
40. GILLES, J.G.; LAVEND'HOMME, R.; PEERLINCK, K.; JACQUEMIN, M.G.; HOYLAERTS, M.; JORIEUX, S.; MAZURIER, C.; VERMYLEN, J.; SAINTREMY, J.M. Some factor VIII (FVIII) inhibitors recognise a FVIII epitope(s) that is present only on FVIII;vWF complexes. **Thrombosis and Haemostasis**, v.82, p.40-45, 1999.
41. GITSCHIER, J.; WOOD, W.I.; GORALKA, T.M.; WION, K.L.; CHEN, E.Y.; EATON, D.H.; VEHAR, G.A.; CAPON, D.J.; LAWN, R.M. Characterization of the human factor VIII gene. **Nature**, v.312, p.326-330, 1984.
42. HAY, C.R.; OLLIER, W.; PEPPER, L.; CUMMING, A.; KEENEY, S.; GOODEVE, A.C.; COLVIN, B.T.; HILL, F.G.; PRESTON, F.E.; PEAKE, I.R. HLA class II profile: a weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe haemophilia A. UKHCDO Inhibitor Working Party. **Thrombosis and Haemostasis**, v.77, p.234-237, 1997.

43. HEALEY, J.F.; BARROW, R.T.; TAMIM, H.M.; LUBIN, I.M.; SHIMA, M.; SCANDELLA, D.; LOLLAR, P. Residues Glu2181-Val2243 contain a major determinant of the inhibitory epitope in the C2 domain of human factor VIII. **Blood**, v.92, p.3701-3709, 1998.
44. HOBBS, K.; NEGRI, J.; KLINNERT, M.; ROSENWASSER, L.J. & BORISH, L. Interleukin-10 and transforming growth factor-beta promoter polymorphisms in allergies and asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.158, p.1958-1962, 1998.
45. HODGE, G.; HAN, P. Factor VIII concentrate inhibits T helper type 2 cytokine production *in vitro*: relevance to inhibitor antibody formation. **Haemophilia**, v.7, p.490-496, 2001.
46. HODGE, G.; SAXON, B.; REVESZ, T. Effect of factor VIII concentrate on leucocyte cytokine receptor expression *in vitro*: relevance to inhibitor formation and tolerance induction. **Haemophilia**, v.12, p.133-139, 2006.
47. HOFFMAN, M. Remodeling the blood coagulation cascade. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v.16, p.17-20, 2003.
48. HOYER, L.W. Hemophilia A. **New England Journal of Medicine**, v.330, p.38-47, 1994.
49. HOYER, L.W. Molecular pathology and immunology of factor VIII (hemophilia A and factor VIII inhibitors). **Human Pathology**, v.18, p.153-161, 1987.
50. HOYER, L.W. Why do so many haemophilia A patients develop an inhibitor? **British Journal of Haematology**, v.90, p.498-501, 1995.
51. HU, G.; GUO, D.; KEY, N.S.; CONTI-FINE, B.M. Cytokine production by CD4+ T cells specific for coagulation factor VIII in healthy subjects and haemophilia A patients. **Thrombosis and Haemostasis**, v.97, p.788-794, 2007.

52. HU, G-L.; OKITA, D.K.; DIETHELM-OKITA, B.M.; CONTI-FINE, B.M. Recognition of coagulation factor VIII by CD4+ T cells of healthy humans. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.1, p.2159-2166, 2003.
53. HUGUET, H.C.; LASNE, D.; ROTHSCHILD, C.; SIALI, R.; JOZEFONVICZ, J. Extracorporeal adsorption of anti-factor VIII allo-antibodies on randomly functionalized polystyrene resins. **Thrombosis and Haemostasis**, v.91, p.259-266, 2004.
54. HUTCHINSON, I.V.; PRAVICA, V.; PERREY, C.; SINNOTT, P. Cytokine gene polymorphisms and relevance to forms of rejection. **Transplantation Proceedings**, v.31, p.734-736, 1999.
55. HUTCHINSON, I.V.; TURNER, D.; SANKARAN, D.; AWAD, M.; PRAVICA, V.; SINNOTT, P. Cytokine genotypes in allograft rejection: guidelines for immunosuppression. **Transplantation Proceedings**. v.30, p.3991–3992, 1998a.
56. HUTCHINSON, I.V.; TURNER, D.M.; SANKARAN, D.; AWAD, M.R.; SINNOTT, P.J. Influence of cytokine genotypes on allograft rejection. **Transplantation Proceedings**. v.30, p.862–863, 1998b.
57. JACQUEMIN, M.G.; DESQUEPER, B.G.; BENHIDA, A.; VANDER ELST, L.; HOYLAERTS, M.F.; BAKKUS, M.; THIELEMANS, K.; ARNOUT, J.; PEERLINCK, K.; GILLES, J.G.; VERMYLEN, J.; SAINT-REMY, J.M. Mechanism and kinetics of factor VIII inactivation: study with an IgG4 monoclonal antibody derived from a hemophilia A patient with inhibitor. **Blood**, v.92, p.496-506, 1998.
58. JOHNSON, V.J.; YUCESOY, B. & LUSTER, M.I. Genotyping of single nucleotide polymorphisms in cytokine genes using real-time PCR allelic discrimination technology. **Cytokine**, v.27, p.135-141, 2004.
59. JULIE, M.W.U.; BENSEN-KENNEDY, D.; MIURA, Y.; THOBURN, C.J.; ARMSTRONG, D.; VOGELSANG, G.B.; HESS, A.D. The effects of interleukin 10 and interferon cytokine gene polymorphisms on survival after autologous bone marrow

transplantation for patients with breast cancer. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**. v.11, p.455-464, 2005.

60. KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. **Biopolymers**, v.22, p.2577–2637, 1983.

61. KANE, W.H.; DAVIE, E.W. Cloning of a cDNA coding for human factor V, a blood coagulation factor homologous to factor VIII and ceruloplasmin. **National Academy of Sciences of the United States of America**, v.83, p.6800-6804, 1986.

62. KESSLER, C.M. Acquired factor VIII autoantibody inhibitors: current concepts and potential therapeutic strategies for the future. **Haematologica**, v.85, p.57-61, 2000.

63. KNOBL, P.; DERFLER, K. Extracorporeal immunoadsorption for the treatment of haemophilic patients with inhibitors to factor VIII or IX. **Vox Sanguinis**, v.77, p.57-64, 1999.

64. KOPECKY E. M., GREINSTETTER S., PABINGER I., BUCHACHER A., ROMISCH J. AND JUNGBAUER A. Effect of oriented or random PEGylation on bioactivity of a factor VIII inhibitor blocking peptide. **Biotechnology and Bioengineering**, v.93, p.647-655, 2006.

65. KOPECKY, E.; GREINSTETTER, S.; PABINGER, I.; BUCHACHER, A.; ROMISCH, J.; JUNGBAUER, A. Combinatorial peptides directed to inhibitory antibodies against human blood clotting factor VIII. **Thrombosis and Haemostasis**. v.94, p.933-941, 2005.

66. KOPECKY, E.; GREINSTETTER, S.; PABINGER, I.; BUCHACHER, A.; ROMISCH, J.; JUNGBAUER, A. Mapping of FVIII inhibitor epitopes using cellulose-bound synthetic peptide arrays. **Journal of Immunological Methods**. v.308, p.90-100, 2006.

67. LACROIX-DESMAZES, S.; MISRA, N.; BAYRY, J.; MOHANTY, D.; KAVERI, S.V.; KAZATCHKINE, M.D. Autoantibodies to factor VIII. **Autoimmunity Reviews**, v.1-2, p.105-110, 2002a.
68. LACROIX-DESMAZES, S.; MISRA, N.; BAYRY, J.; VILLARD, S.; KAZATCHKINE, M.D.; KAVERI, S.V. Antibodies with hydrolytic activity towards factor VIII in patients with hemophilia A. **Journal of Immunological Methods**, v.269, p.251-256, 2002b.
69. LACROIX-DESMAZES, S.; WOOTLA, B.; DASGUPTA, S.; DELIGNAT, S.; BAYRY, J.; REINBOLT, J.; HOEBEKE, J.; SAENKO, E.; KAZATCHKINE, M.D.; FRIBOULET, A.; CHRISTOPHE, O.; NAGARAJA, V.; KAVERI, S.V. Catalytic IgG from patients with hemophilia A inactivate therapeutic factor VIII. **The Journal of Immunology**, v.177, p.1355-1363, 2006.
70. LAUNE, D.; MOLINA, F.; FERRIERES, G.; VILLARD, S.; BES, C.; RIEUNIER, F.; CHARDES, T.; GRANIER, C. Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. **Journal of Immunological Methods**, v.267, p.53-70, 2002.
71. LAVIGNE-LISSALDE, G.; SCHVED, J.F.; GRANIER, C.; VILLARD, S. Anti-factor VIII antibodies: a 2005 update. **Thrombosis and Haemostasis**, v.94, p.760-769, 2005.
72. LAZARUS, M.; HAJEER, A.H.; TURNER D.; SINNOTT, P.; WORTHINGTON, J.; OLLIER, W.E.; HUTCHINSON, I.V. Genetic variation in the interleukin 10 gene promoter and systemic lupus erythematosus. **The Journal of Rheumatology**. v.24, p.2314–2317, 1997.
73. LEE, C.A.; LILLICRAP, D.; ASTERMARK, J. Inhibitor development in hemophiliacs: the roles of genetic versus environmental factors. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v.32, p10-14, 2006.

74. LENTING, P.J.; VAN MOURIK, J.A.; MERTENS, K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. **Blood**, v.92, p.3983-3996, 1998.
75. LEVINSON, B.; BERMINGHAM, JR; METZENBERG, A.; KENWRICK, S.; CHAPMAN, V.; GITSCHIER, J. Sequence of the human factor VIII-associated gene is conserved in mouse. **Genomics**, v.13, p.862-865, 1992.
76. LIPPERT, L.E.; FISHER, L.M.; SCHOOK, L.B. Relationship of major histocompatibility complex class II genes to inhibitor antibody formation in hemophilia A. **Thrombosis and Haemostasis**. v.64, p.564-568, 1990
77. LIU, Z.; COLPAERT, S.; D'HAENS, G.R., KASRAN, A.; DE BOER, M.; RUTGEERTS, P.; GEBOES, K. & CEUPPENS, J.L. Hyperexpression of CD40 ligand (CD154) in inflammatory bowel disease and its contribution to pathogenic cytokine production. **Journal of Immunology**, v.163, p.4049-4057, 1999.
78. LOLLAR, P. Analysis of factor VIII inhibitors using hybrid human/porcine factor VIII. **Thrombosis and Haemostasis**, v.78, p.647-651, 1997.
79. LOLLAR, P.; KNUTSON, G.J.; FASS, D.N. Activation of porcine factor VIII:C by thrombin and factor Xa. **Biochemistry**, v.24, p.8056-8064, 1985.
80. LUBAHN, B.C.; WARE J.; STAFFORD, D.W.; REISNER, H.M. Identification of a FVIII epitope recognized by a human hemophilic inhibitor. **Blood**, v.73, p.497-499, 1989.
81. MAYR, W.R.; LECHNER, K.; NIESSNER, H.; PABINGER-FASCHING, I. HLA-DR and factor VIII antibodies in hemophilia A. **Thrombosis and Haemostasis**. v.51, p.263, 1984.
82. MOFFATT, M.F. & COOKSON, W.O. Tumour necrosis factor haplotypes and asthma. **Human Molecular Genetics**, v.6, p.551-554, 1997.

83. MORREAU, V.; FLEURY, C.; PIQUER, D.; NGUYEN, C.; NOVALI, N.; VILLARD, S.; LAUNE, D.; GRANIER, C.; MOLINA, F. PEPOP: computational design of immunogenic peptides. **BMC Bioinformatics**, v.30, p.1-15, 2008.
84. MORRISON, A.E.; LUDLAM, C.A.; KESSLER, C. Use of porcine factor VIII in the treatment of patients with acquired hemophilia. **Blood**, v.81, p.1513-1520, 1993.
85. MYHR, K.M.; VAGNES, K.S.; MAROY, T.H.; AARSETH, J.H.; NYLAND, H.I.; VEDELER, C.A. Interleukin-10 promoter polymorphisms in patients with multiple sclerosis. **Journal of Neurological Science**, v.202, p.93-97, 2002.
86. NADEL, S.; NEWPORT, M.J.; BOOY, R.; LEVIN, M. Variation in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease. **The Journal of Infectious Disease**, v.174, p.878-880, 1996.
87. NOGAMI, K.; SHIMA, M.; NAKAI, H.; TANAKA, I.; SUZUKI, H.; MORICHIKA, S.; SHIBATA, M.; SAENKO, E.L.; SCANDELLA, D.; GIDDINGS, J.C.; YOSHIOKA, A. Identification of a factor VIII peptide, residues 2315-2330, which neutralizes human factor VIII C2 inhibitor alloantibodies: requirement of Cys2326 and Glu2327 for maximum effect. **British Journal of Haematology**, v.107, p.196-203, 1999.
88. NUNEZ-ROLDAN, A.; ARNAIZ-VILLENA, A.; NUNEZ-OLLERO, G. Genetic control by the HLA region of the immune response to factor VIII in hemophilic patients. **Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences. Série D, Sciences Naturelles**. v.288, p.1719-1720, 1979.
89. OLDENBURG, J.; BRACKMANN, H.H.; SCHWAAB, R. Risk factors for inhibitor development in hemophilia A. **Haematologica**, v.85, p.7-13, 2000.
90. OLDENBURG, J.; EL-MAARRI, O.; SCHWAAB, R. Inhibitor development in correlation to factor VIII genotypes. **Haemophilia**, v.8, p.23-29, 2002.

91. OLDENBURG, J.; PAVLOVA, A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. **Haemophilia**, v.12, p.15-22, 2006.
92. OLDENBURG, J.; PICARD, J.K.; SCHWAAB, R.; BRACKMANN, H.H.; TUDDENHAM, E.G.; SIMPSON, E. HLA genotype of patients with severe haemophilia A due to *intron 22* inversion with and without inhibitors of factor VIII. **Thrombosis and Haemostasis**, v.77, p.238-242, 1997.
93. ORSINI, F.; ROTSCCHILD, C.; BEURRIER, P.; FARADJI, A.; GOUDEMANT, J.; POLACK, B. Immune tolerance induction with highly purified plasma-derived factor VIII containing von Willebrand factor in hemophilia A patients with high-responding inhibitors. **Haematologica**, v.90, p.1288-1290, 2005.
94. PALMER, D.S.; DUDANI, A. K.; DROUIN, J.; GANZ, P.R. Identification of novel factor VIII inhibitor epitopes using synthetic peptide arrays. **Vox Sanguinis**, v.72, p.148-161, 1997.
95. PAPASTERIADES, C.; VARLA, M.; ECONOMIDOU, J.; MARCACIS, K.; MITSOULI, C.; LOUISOU, K.; MANDALAKI, T.; ROUMELIOTOU, A.; PAPAEVANGELOU, G. High frequency of HLA-DR5 in Greek patients with haemophilia B. **Tissue Antigens**. v.28, p.84-87, 1986.
96. PEERLINCK, K.; ARNOUT, J.; DI GIAMBATTISTA, M.; GILLES, J.G.; LAUB, R.; JACQUEMIN, M. SAINT-REMY, J.M.; VERMYLEN, J. Factor VIII inhibitors in previously treated haemophilia A patients with a double virus-inactivated plasma derived factor VIII concentrate. **Thrombosis and Haemostasis**, v.77, p.80-86, 1997.
97. PEERLINCK, K.; ARNOUT, J.; GILLES, J.G.; SAINT-REMY, J.M.; VERMYLEN, J. A higher than expected incidence of factor VIII inhibitors in multitransfused haemophilia A patients treated with an intermediate purity pasteurized factor VIII concentrate. **Thrombosis and Haemostasis**, v.69, p.115-118, 1993.

98. PRATT, K.P.; SHEN, B.W.; TAKESHIMA, K.; DAVIE, E.W.; FUJIKAWA, K.; STODDARD, B.L. Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution. **Nature**, v.402, p.439-442, 1999.
99. PRAVICA, V.; ASDERAKIS, A.; PERREY, C.; HAJEER, A.; SINNOTT, P.J. & HUTCHINSON, I.V. *In vitro* production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. **European Journal of Immunogenetics: Official Journal of the British Society of Histocompatibility and Immunogenetics**, v.26, p.1-3, 1999.
100. PUNNONEN, J.; AVERSA, G.; COCKS, B.G.; MCKENZIE, A.N.; MENON, S.; ZURAWSKI, G. DE WAAL MALEFYT, R.; DE VRIES, J.E. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, p.3730-3734, 1993.
101. RAUT, S.; VILLARD, S.; GRAILLY, S.; GILLES, J.G.; GRANIER, C.; SAINT-REMY, J.R.; BARROWCLIFFE, T.W. Anti-heavy-chain monoclonal antibodies directed to the acidic regions of the factor VIII molecule inhibit the binding of factor VIII to phospholipids and von Willebrand factor. **Thrombosis and Haemostasis**, v.90, p.385-397, 2003.
102. REDING, M.T. Immunological aspects of inhibitor development. **Haemophilia**, v.12, p.30-35, 2006.
103. REDING, M.T.; LEI, S.; LEI, H.; GREEN, D.; GILL, J.; CONTI-FINE, B.M. Distribution of Th1- and Th2-induced anti-factor VIII IgG subclasses in congenital and acquired hemophilia patients. **Thrombosis and Haemostasis**, v.88, p.568-575, 2002.
104. REDING, M.T.; OKITA, D.K.; DIETHELM-OKITA, B.M.; ANDERSON, T.A.; CONTI-FINE, B.M. Human CD4<sup>+</sup> T-cell epitope repertoire on the C2 domain of coagulation factor VIII. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. v.1, p.1777-1784, 2003.

105. REDING, M.T.; WU, H.; KRAMPF, M.; OKITA, D.K.; DIETHELM-OKITA, B.M.; KEY, N.S.; CONTI-FINE, B.M. CD4+ T cell response to factor VIII in hemophilia A, acquired hemophilia, and healthy subjects. **Thrombosis and Haemostasis**, v.82, p509-515, 1999.
106. REDING, M.T.; WU, H.; KRAMPF, M.; OKITA, D.K.; DIETHELM-OKITA, B.M.; CHRISTIE, B.A.; KEY, N.S.; CONTI-FINE, B.M. Sensitization of CD4+ T cells to coagulation factor VIII: response in congenital and acquired hemophilia patients and in healthy subjects. **Thrombosis and Haemostasis**, v.84, p.643-652, 2000.
107. REIPERT, B.M.; SASGARY, M.; AHMAD, R.U.; AUER, W.; TURECEK, P.L.; SCHWARZ, H.P. Blockade of CD40/CD40 ligand interactions prevents induction of factor VIII inhibitors in hemophilic mice but does not induce lasting immune tolerance. **Thrombosis and Haemostasis**, v.86, p.1345-1352, 2001.
108. RIZZA, C.R.; SPOONER, R.J. Treatment of haemophilia and related disorders in Britain and Northern Ireland during 1976-80: report on behalf of the directors of haemophilia centres in the United Kingdom. **British Medical Journal (Clinical Research Ed.)**, v.286, p.929-933, 1983.
109. ROOD, M.J.; VAN KRUGTEN, M.V.; ZANELLI, E., VAN DER LINDEN, M.W.; KEIJSERS, V.; SCHREUDER, G.M.; VERDUYN, W.; WESTENDORP, R.G.; DE VRIES, R.R.; BREEDVELD, F.C.; VERWEIJ, C.L. & HUIZINGA, T.W. TNF-308A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v.43, p.129-134, 2000.
110. ROSADO, S.; RUA-FIGUEROA, I.; VARGAS, J.A.; GARCIA-LAORDEN, M.I.; LOSADA-FERNANDEZ, I.; MARTIN-DONAIRE, T.; PEREZ-CHACON, G.; RODRIGUEZ-GALLEGO, C.; NARANJO-HERNANDEZ, A.; OJEDA-BRUNO, S.; CITORES, M.J. & PEREZ-ACIEGO, P. Interleukin-10 promoter polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus from the Canary Islands. **International Journal of Immunogenetics**, v.35, p.235-242, 2008.

111. ROSENDAAL, F.R.; NIEUWENHUIS, H.K.; VAN DEN BERG, H.M.; HEIJBOER, H.; MAUSER-BUNSCHOTEN, E.P.; VAN DER MEER, J. SMIT, C.; STRENGERS, P.F.; BRIET, E. A sudden increase in factor VIII inhibitor development in multitransfused hemophilia A patients in The Netherlands. Dutch Hemophilia Study Group. **Blood**, v.81, p.2180-2186, 1993.
112. SAENKO, E.L.; SHIMA, M.; GILBERT, G.E.; SCANDELLA, D. Slowed release of thrombin-cleaved factor VIII from von Willebrand factor by a monoclonal and a human antibody is a novel mechanism for FVIII inhibition. **The Journal of Biological Chemistry**, v.271, p.27424-27431, 1996.
113. SAENKO, E.L.; SHIMA, M.; RAJALAKSHMI, K.J; SCANDELLA, D. A role for the C2 domain of factor VIII in binding to von Willebrand factor. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.11601-11605, 1994.
114. SANKARAN, D.; ASDERAKIS, A.; ASHRAF, S.; ROBERTS, I.S.; SHORT, C.D.; DYER, P.A.; SINNOTT, P.J.; HUTCHINSON, I.V. Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. **Kidney International**. v.56, p.281-288, 1999.
115. SASGARY, M.; AHMAD, R.U.; SCHWARZ, H.P.; TURECEK, P.L.; REIPERT, B.M. Single cell analysis of factor VIII-specific T cells in hemophilic mice after treatment with human factor VIII. **Thrombosis and Haemostasis**, v.87, p.266-272, 2002.
116. SAWAMOTO, Y.; PRESCOTT, R.; ZHONG, D.; SAENKO, E.L.; MAUSERBUNSCHOTEN, E.; PEERLINCK, K. VAN DEN BERG, M.; SCANDELLA, D. Dominant C2 domain epitope specificity of inhibitor antibodies elicited by a heat pasteurized product, factor VIII CPS-P, in previously treated hemophilia A patients without inhibitors. **Thrombosis and Haemostasis**, v.79, p.62-68, 1998.
117. SCANDELLA, D.; GILBERT, G.E.; SHIMA, M.; NAKAI, H.; EAGLESON, C.; FELCH, M.; PRESCOTT, R.; RAJALAKSHMI, K.J.; HOYER, L.W.; SAENKO, E.

Some factor VIII inhibitor antibodies recognize a common epitope corresponding to C2 domain amino acids 2248 through 2312, which overlap a phospholipid-binding site. **Blood**, v.86, p.1811-1819, 1995.

118. SCANDELLA, D.; NAKAI, H.; FELCH, M.; MONDORF, W.; SCHARRER, I.; HOYER, L.W.; SAENKO, E.L. In hemophilia A and autoantibody inhibitor patients: the factor VIII A2 domain and light chain are most immunogenic. **Thrombosis Research**, v.101, p.377-385, 2001.

119. SCASSELLATI, C.; ZANARDINI, R.; SQUITTI, R.; BOCCHIO-CHIAVETTO, L.; BONVICINI, C.; BINETTI, G.; ZANETTI, O.; CASSETTA, E. & GENNARELLI, M. Promoter haplotypes of interleukin-10 gene and sporadic Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v.356, p.119-122, 2004.

120. SCHWAAB, R.; BRACKMANN, H.H.; MEYER, C.; SEEHAFFER, J.; KIRCHGESSER, M.; HAACK, A.; OLEK, K.; TUDDENHAM, E.G.; OLDENBURG, J. Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. **Thrombosis and Haemostasis**, v.74, p. 1402-1406, 1995.

121. SHAPIRO, S.S. The immunologic character of acquired inhibitors of antihemophilic globulin (factor 8) and the kinetics of their interaction with factor 8. **The Journal of Clinical Investigation**, v.46, p.147-156, 1967.

122. SHIMA, M.; SCANDELLA, D.; YOSHIOKA, A.; NAKAI, H.; TANAKA, I.; KAMISUE, S.; TERADA, S.; FUKUI, H. A factor VIII neutralizing monoclonal antibody and a human inhibitor alloantibody recognizing epitopes in the C2 domain inhibit factor VIII binding to von Willebrand factor and to phosphatidylserine. **Thrombosis and Haemostasis**. v.69, p.240-246, 1993.

123. SIMONNEY, N.; DE BOSCH, N.; ARGUEYO, A.; GARCIA, E.; LAYRISSE, Z. HLA antigens in hemophiliacs A with or without factor VIII antibodies in a Venezuelan Mestizo population. **Tissue Antigens**. v.25, p.216-219, 1985.

124. SINGER, S.T.; ADDIEGO, J.E.; REASON, D.C.; LUCAS, A.H. T lymphocyte proliferative responses induced by recombinant factor VIII in hemophilia A patients with inhibitors. **Thrombosis and Haemostasis**, v.76, p.17-22, 1996.
125. STOCKERT, R.J. The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression. **Physiological Review**, v.75, p.591-609, 1995.
126. TAM, J.P.; WU, C.; LIU, W.; ZHANG, J.W. Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxide. Scope and applications. **Journal of American Chemical Society**, v.113, p.6657-6662, 1991.
127. TAMAMURA, H.; OMAGARI, A.; HIRAMATSU, K.; GOTOH, K.; KANAMOTO, T.; XU, Y.; KODAMA, E.; MATSUOKA, M.; HATTORI, T.; YAMAMOTO, N.; NAKASHIMA, H.; OKATA, A.; FUJI, N. Development of specific CXCR4 inhibitors possessing high selectivity indexes as well as complete stability in serum based on an anti-HIV peptide T140. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.11, p.1897-1902, 2001.
128. TIZZANO, E.F.; CORNET, M.; DOMENECH, M.; BAIGET, M. Modifier genes in haemophilia: their expansion in the human genome. **Haemophilia**, v.8, p.250-254, 2002.
129. TOOLE, J.J.; KNOPF, J.L.; WOZNEY, J.M.; SULTZMAN, L.A.; BUECKER, J.L.; PITTMAN, D.D.; KAUFMAN, R.J.; BROWN, E.; SHOEMAKER, C.; ORR, E.C.. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. **Nature**, v.312, p.342-347, 1984.
130. TOWFIGHI, F.; GHARAGOZLOU, S.; KARDAR, G.; SHARIFIAN, R.; KARIMI, K.; LAK, M.; POURFATHOLLAH, A.; SOLEIMANI, S.; SHOKRI, F. Assessment of in vitro cytokine response in hemophilia A patients with or without factor VIII inhibitory antibody. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v.27, p.665-673, 2007.

131. TUDDENHAM, E.G. & MC VEY, J.H. The genetic basis of inhibitor development in haemophilia A. **Haemophilia**.v.4, p.543-545, 1998.
132. TURNER, D.M.; WILLIAMS, D.M.; SANKARAN, D.; LAZARUS, M.; SINNOT, P.J.; HUTCHINSON, I.V. An investigation of the polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **European Journal of Immunogenetics**. v.24, p.1-8, 1997.
133. VEHAR, G.A.; KEYT, B.; EATON, D.; RODRIGUEZ, H.; O'BRIEN, D.P.; ROTBLAT, F. OPPERMANN, H.; KECK, R.; WOOD, W.I.; HARKINS, R.N. Structure of human factor VIII. **Nature**, v.312, p.337-342, 1984.
134. VERBRUGGEN, B.; NOVAKOVA, I.; WESSELS, H.; BOEZEMAN, J.; VAN DEN BERG, M.; MAUSER-BUNSCHOTEN, E. The Nijmegen modification of Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. **Thrombosis and Haemostasis**, v.73, p.247-251, 1995.'
135. VERBRUGGEN, B.; VAN HEERDE, W.; NOVÁKOVÁ, I.; LILICRAP, D.; GILES, A. A 4% solution of bovine serum albumin may be used in place of factor VIII:C deficient plasma in the control sample in the Nijmegen Modification of the Bethesda factor VIII:C inhibitor assay. **Thrombosis and Haemostasis**, v.88, p.362-364, 2002.
136. VIEL, K.R.; AMERI, A.; ABSHIRE, T.C.; IYER, R.V.; WATTS, R.G.; LUTCHER, C.; CHANNELL, C.; COLE, S.A.; FERNSTROM, K.M.; NAKAYA, S.; KASPER, C.K.; THOMPSON, A.R.; ALMASY, L.; HOWARD, T.E. Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia. **The New England Journal of Medicine**, v.360, p.1618-1627, 2009.
137. VILLARD, S.; LACROIX-DESMAZES, S.; KIEBER-EMMONS, T.; PIQUER, D.; GRAILLY, S.; BENHIDA, A.; KAVERI, S.V.; SAINT-REMY, J.; GRANIER, C. Peptide decoys selected by phage display block in vitro and in vivo activity of a human anti-FVIII inhibitor. **Blood**, v.102, p.949-952, 2003.

138. VILLARD, S.; PIQUER, D.; RAUT, S.; LÉONETTI, J.; SAINT-REMY, J.; GRANIER, C. Low molecular weight peptides restore the procoagulant activity of factor VIII in the presence of the potent inhibitor antibody ESH8. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, n.30, p.27232-27239, 2002.
139. VITELLI-AVELAR, D.M.; SATHLER-AVELAR, R.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; PINTO DIAS, J.C.; GONTIJO, E.D.; FARIA, A.M.; ELÓI-SANTOS, S.M.; MARTINS-FILHO, O.A. Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.68, p.516-525, 2008.
140. WERGELAND, S.; BEISKE, A.; NYLAND, H.; HOVDAL, H.; JENSEN, D.; LARSEN, J.P.; MAROY, T.H.; SMIEVOLL, A.I.; VEDELER, C.A.; MYHR, K.M. IL-10 promoter haplotype influence on interferon treatment response in multiple sclerosis. **European Journal of Neurology: The Official Journal of the European Federation of Neurological Societies**, v.12, 171-175, 2005.
141. WILSON, A.G.; DI GIOVINE, F.S.; BLAKEMORE, A.I. & DUFF, G.W. Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. **Human Molecular Genetics**, v.1, p.353, 1992.
142. WOOD, W.I.; CAPON, D.J.; SIMONSEN, C.C.; EATON, D.L.; GITSCHIER, J.; KEYT, B.; SEEBURG, P.H.; SMITH, D.H.; HOLLINGSHEAD, P.; WION, K.L. Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. **Nature**, v.312, p.330-337, 1984.
143. WU, J.M.; BENSON-KENNEDY, D.; MIURA, Y.; THOBURN, C.J.; ARMSTRONG, D.; VOGELSANG, G.B.; HESS, A.D. The effects of interleukin 10 and interferon cytokine gene polymorphisms on survival after autologous bone marrow transplantation for patients with breast cancer. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v.11, p.455-464, 2005.

144. ZHONG, D.; SAENKO, E.L.; SHIMA, M.; FELCH, M.; SCANDELLA, D. Some human inhibitor antibodies interfere with factor VIII binding to Factor IX. **Blood**, v.92, p.136-142, 1998.

## **9. ANEXOS**

# ANEXO I

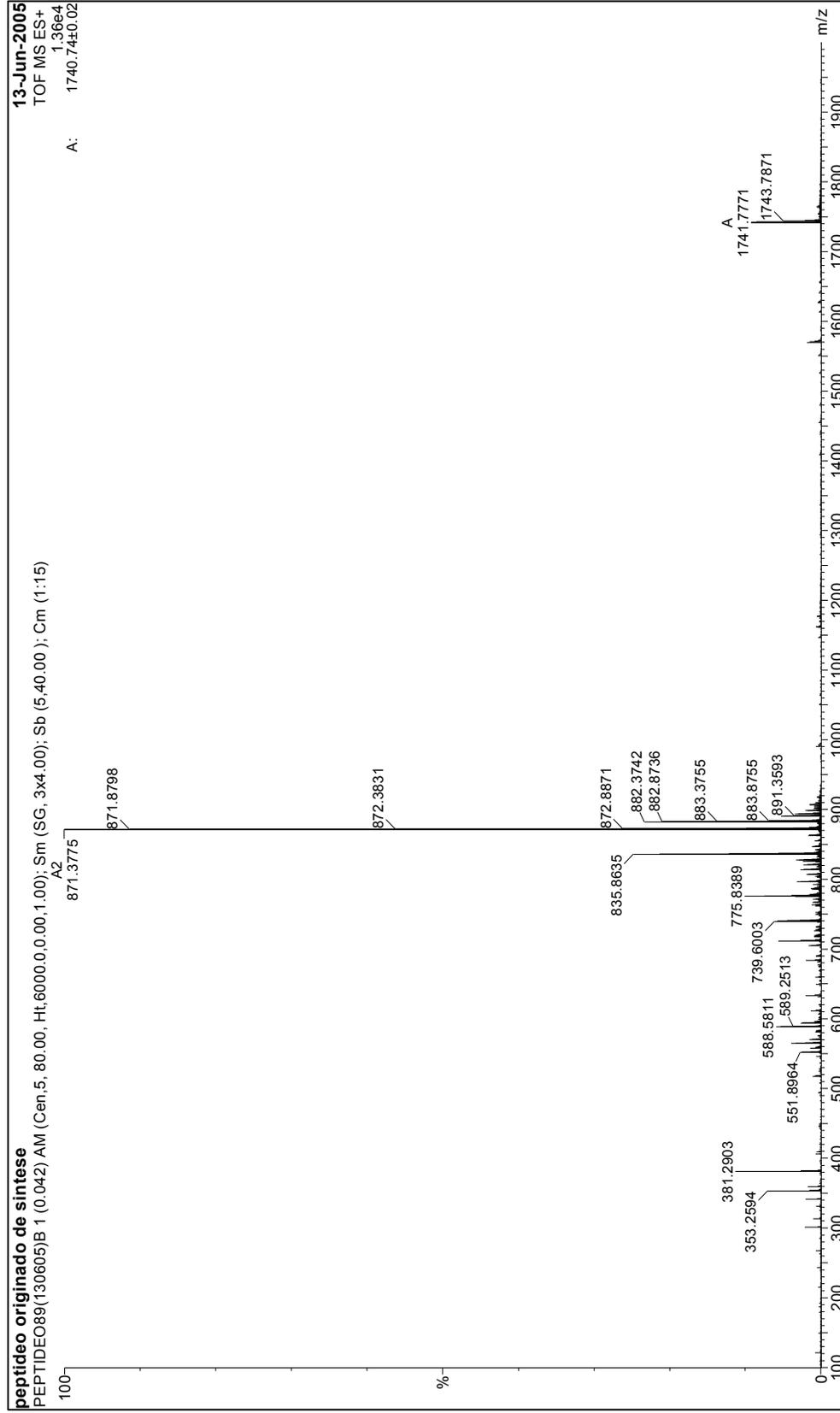
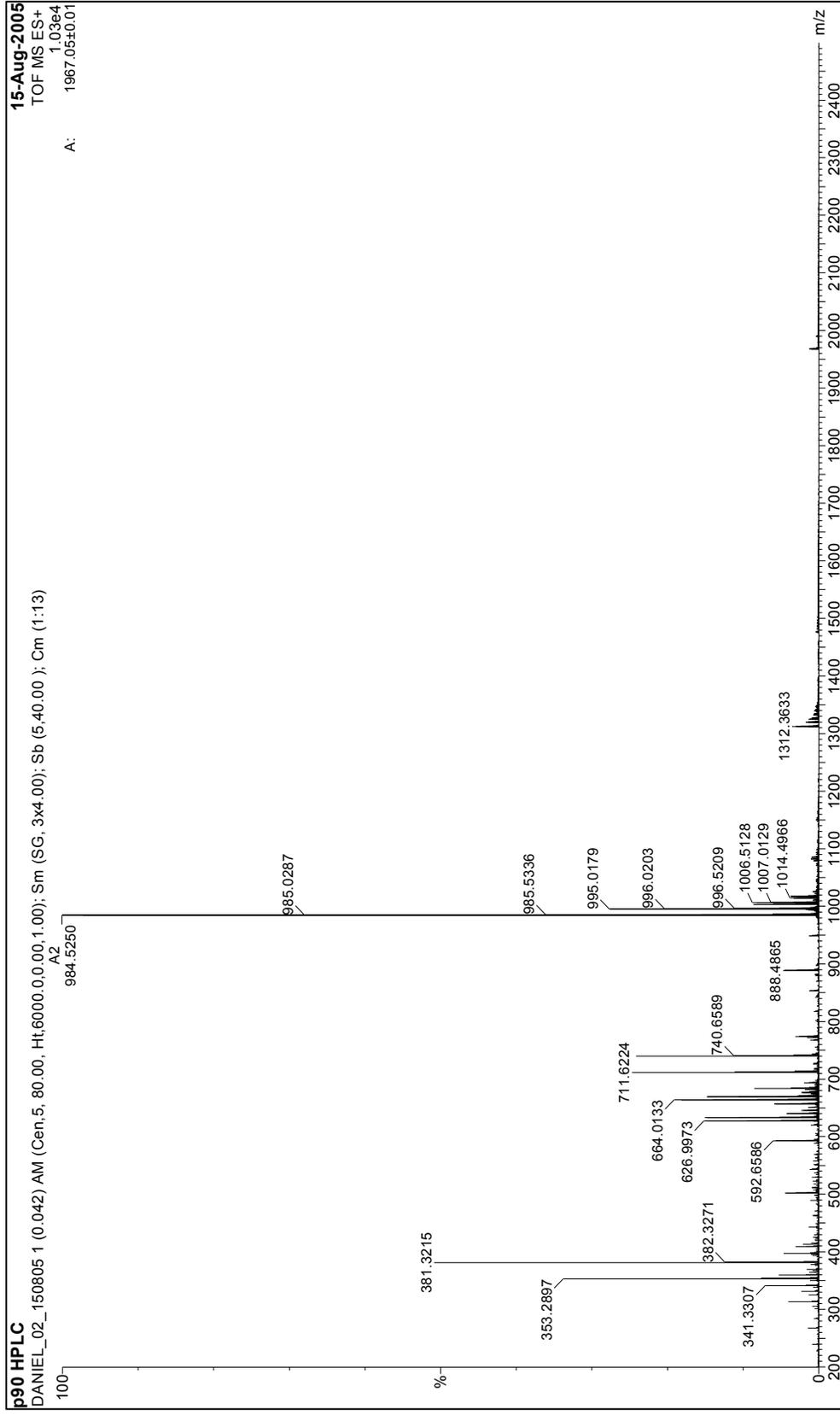


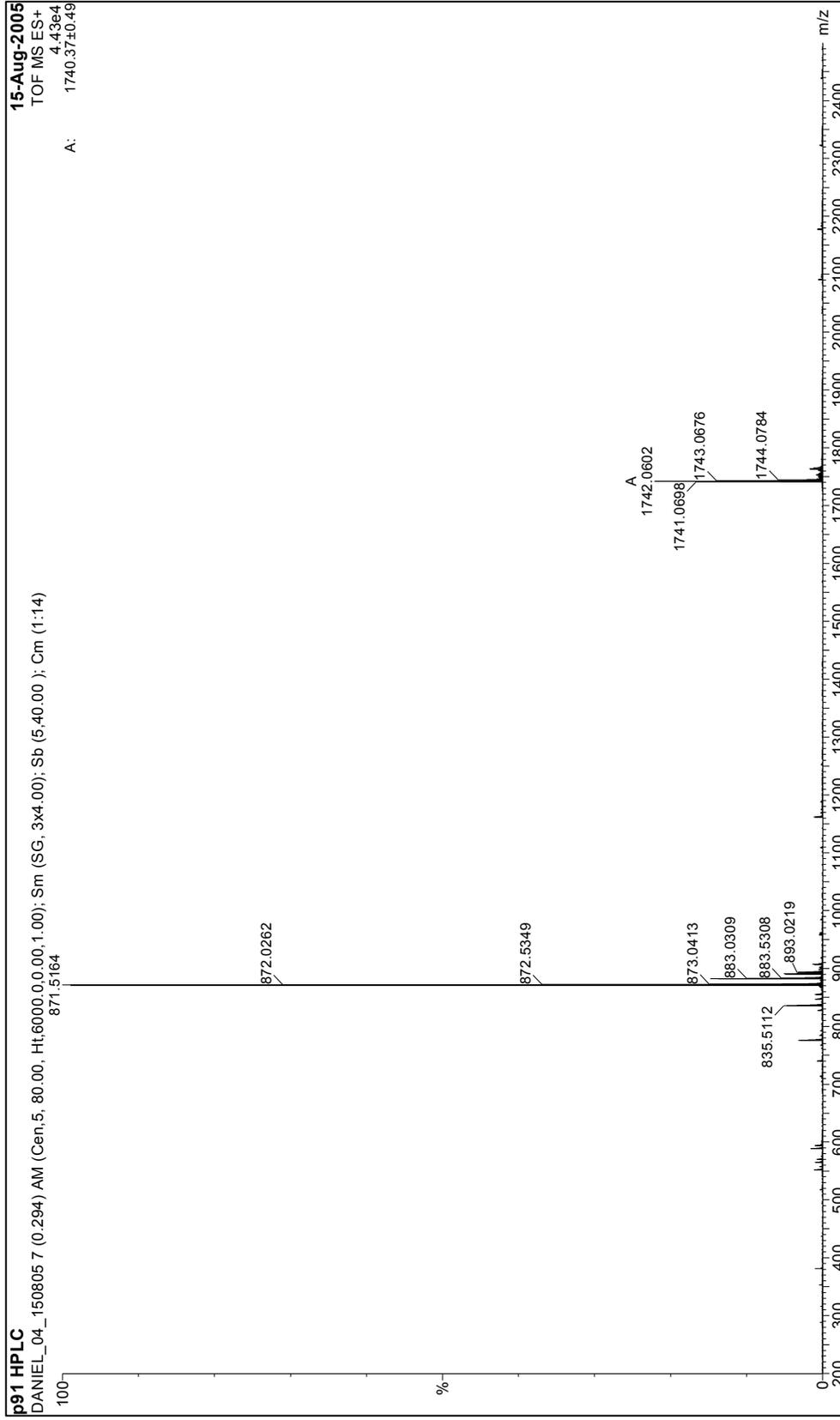
Figura 20: Perfil em espectrômetro de massa do peptídeo 89 depois da purificação em coluna C18.

## ANEXO 2



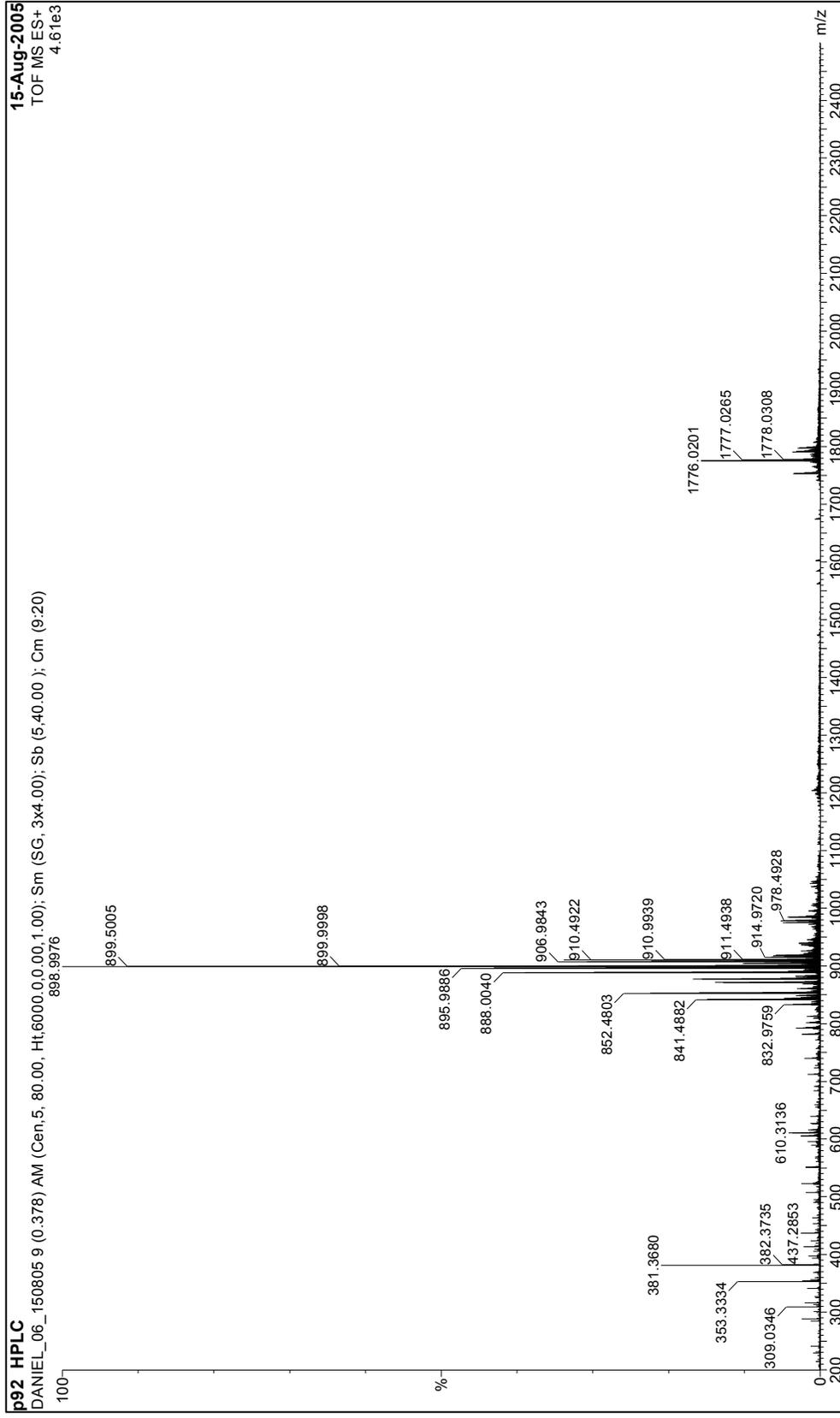
**Figura 21:** Perfil em espectrômetro de massas do peptídeo 90 depois da purificação em coluna C18.

### ANEXO 3



**Figura 22:** Perfil em espectrômetro de massas do peptídeo 91 depois da purificação em coluna C18.

# ANEXO 4



**Figura 23:** Perfil em espectrômetro de massas do peptídeo 92 depois da purificação em coluna C18.

# ANEXO 5

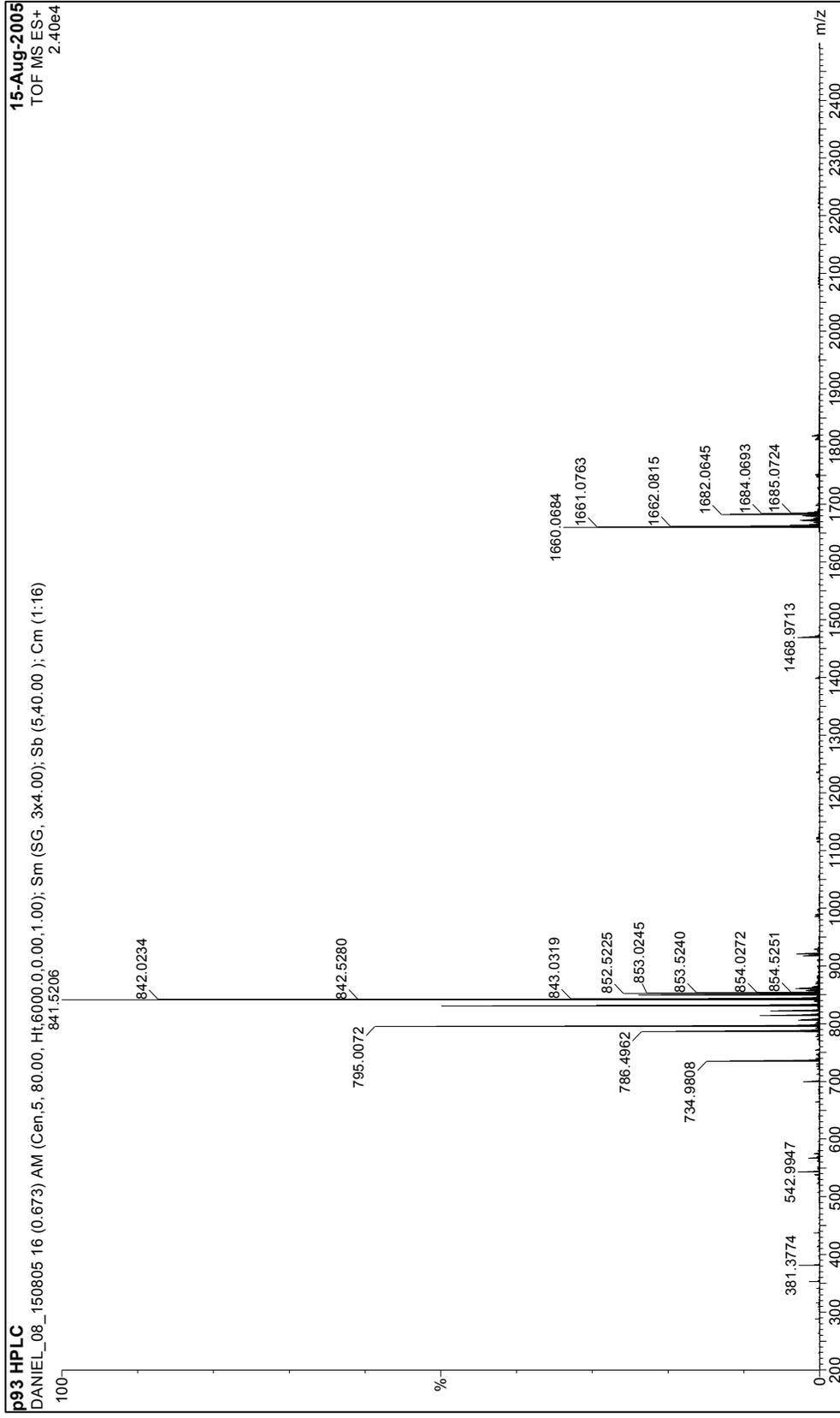


Figura 24: Perfil em espectrômetro de massas do peptídeo 93 depois da purificação em coluna C18.

# ANEXO 6

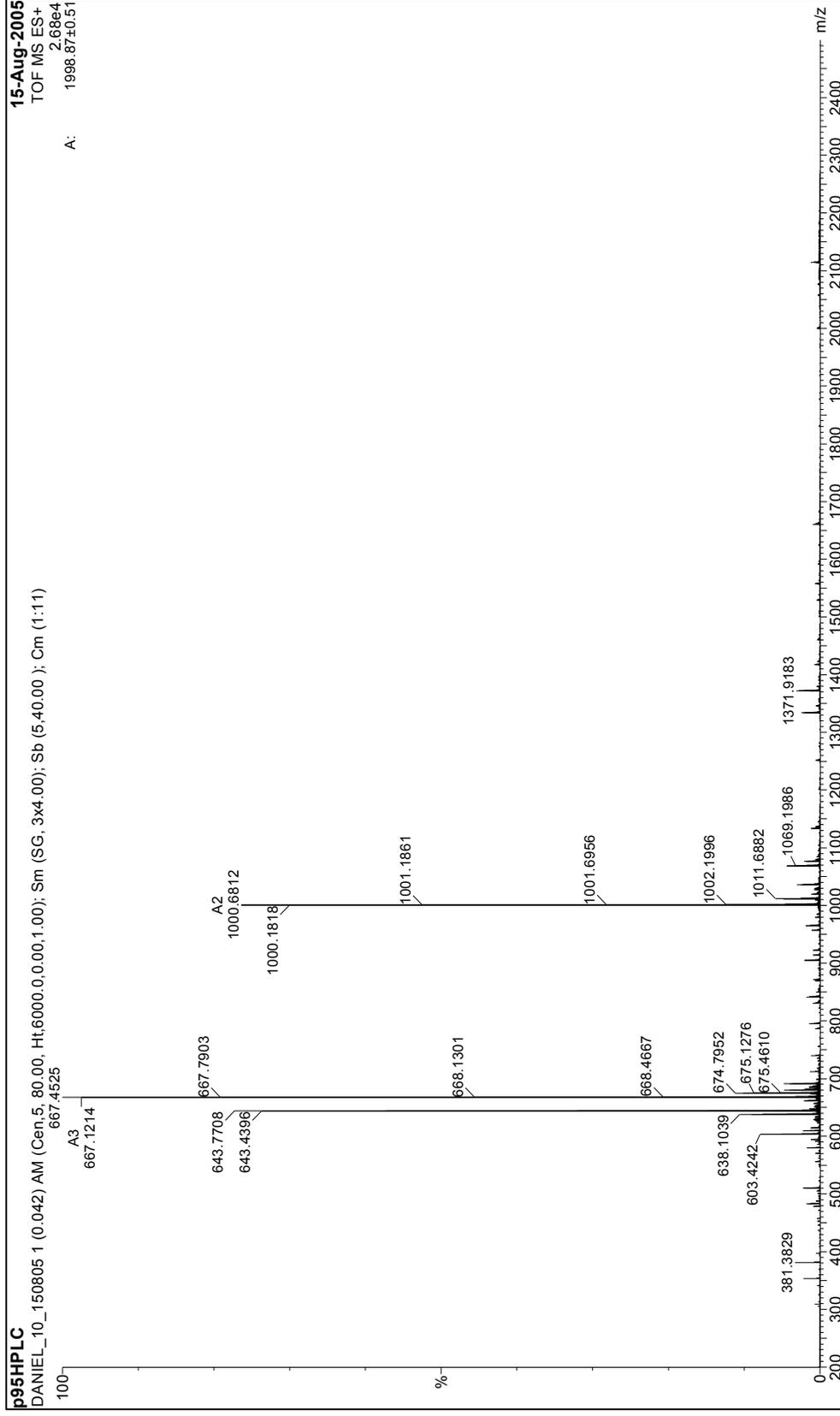
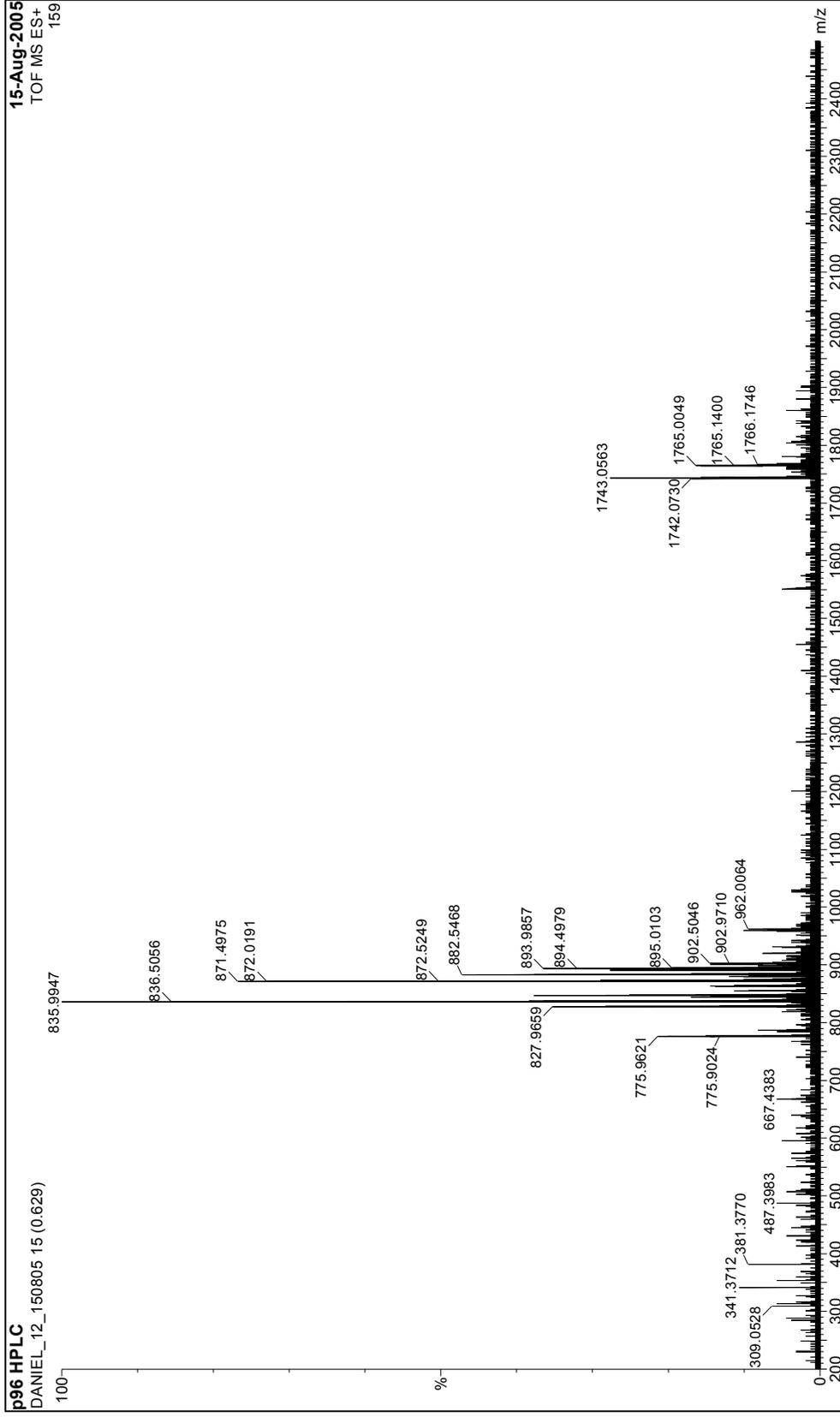


Figura 25: Perfil em espectrômetro de massas do peptídeo 95 depois da purificação em coluna C18.

# ANEXO 7



**Figura 26:** Perfil em espectrômetro de massas do peptídeo 96 depois da purificação em coluna C18.

# ANEXO 8

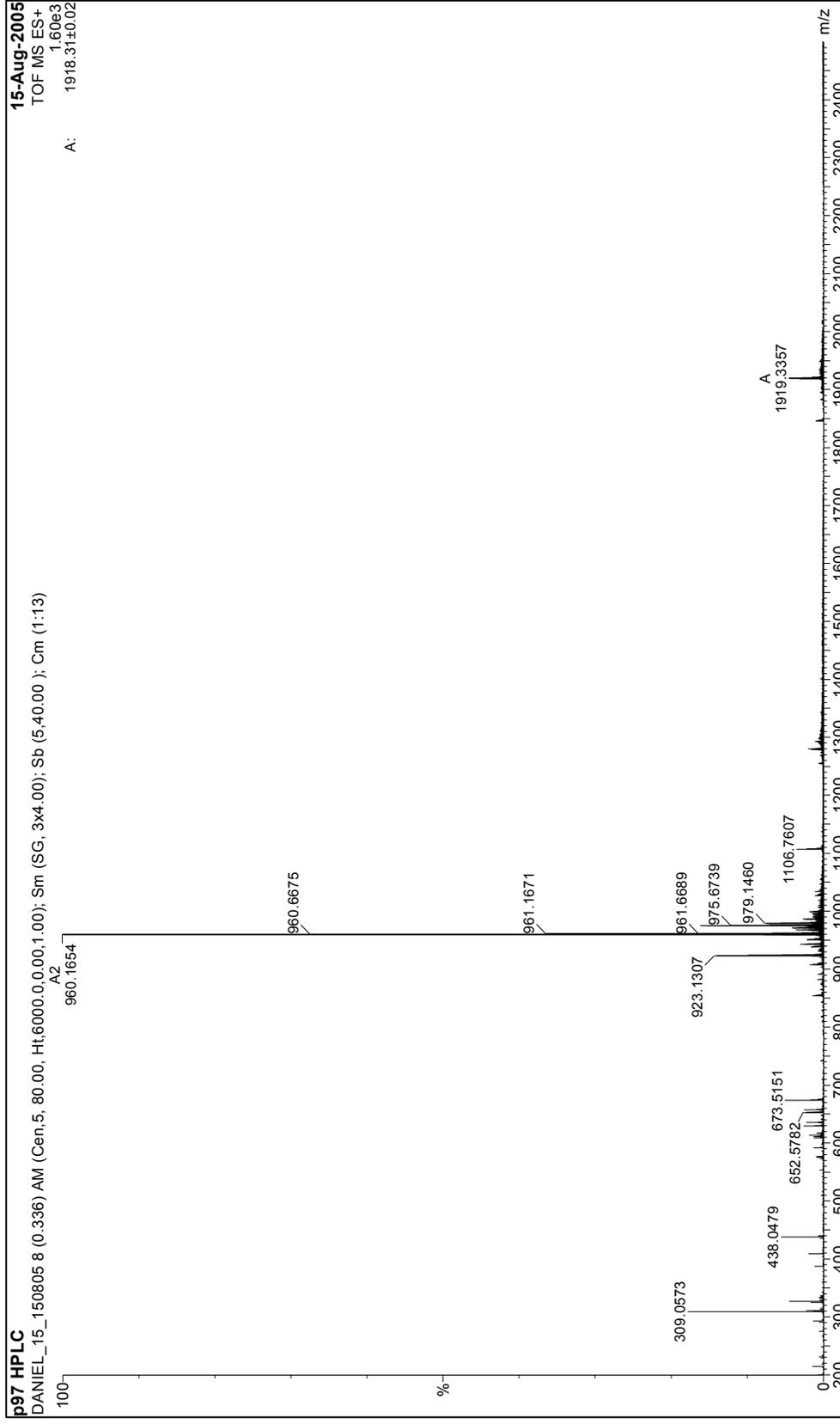


Figura 27: Perfil em espectrômetro de massas do peptídeo 97 depois da purificação em coluna C18.

# ANEXO 9

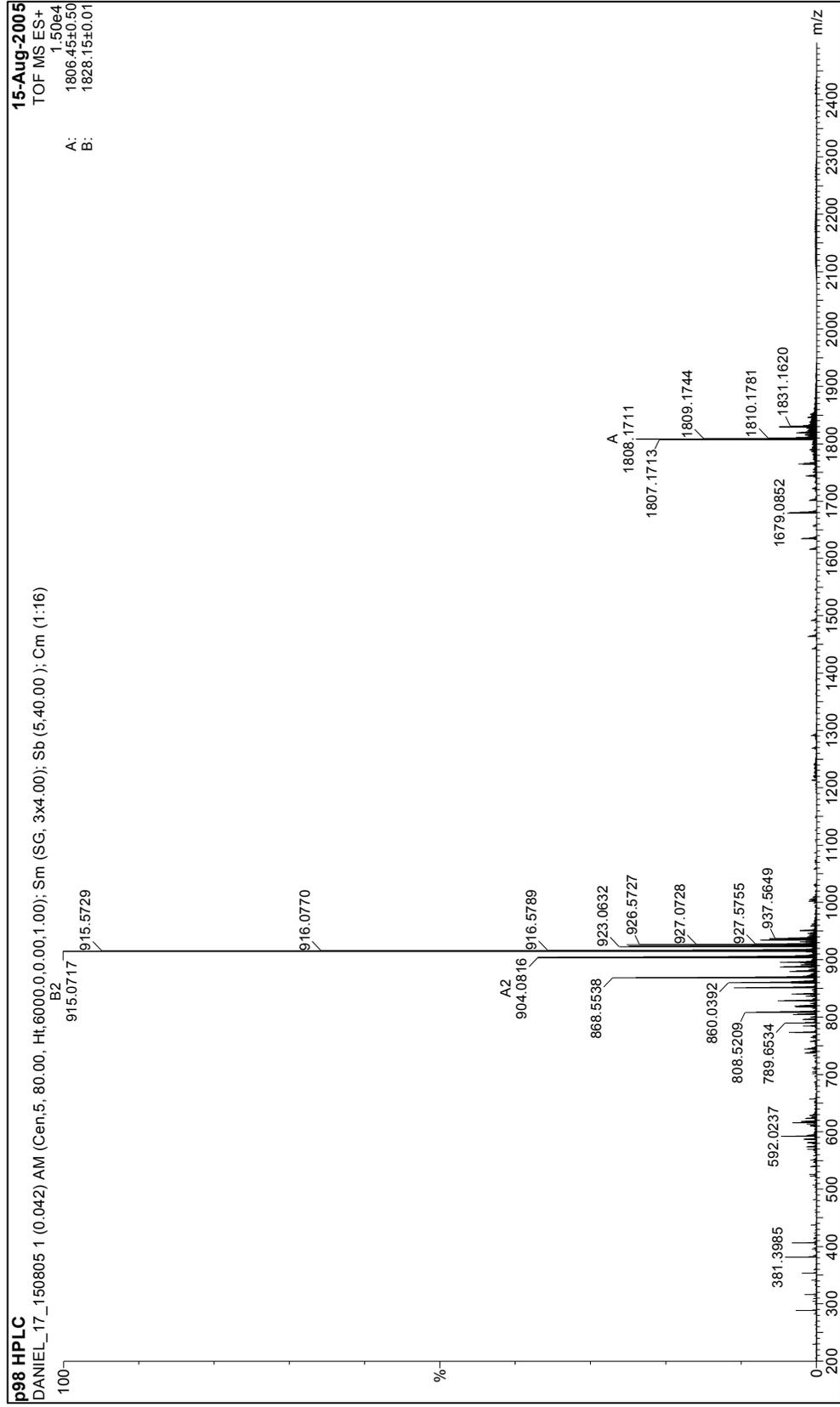


Figura 28: Perfil em espectrômetro de massas do peptídeo 98 depois da purificação em coluna C18.

# ANEXO 10

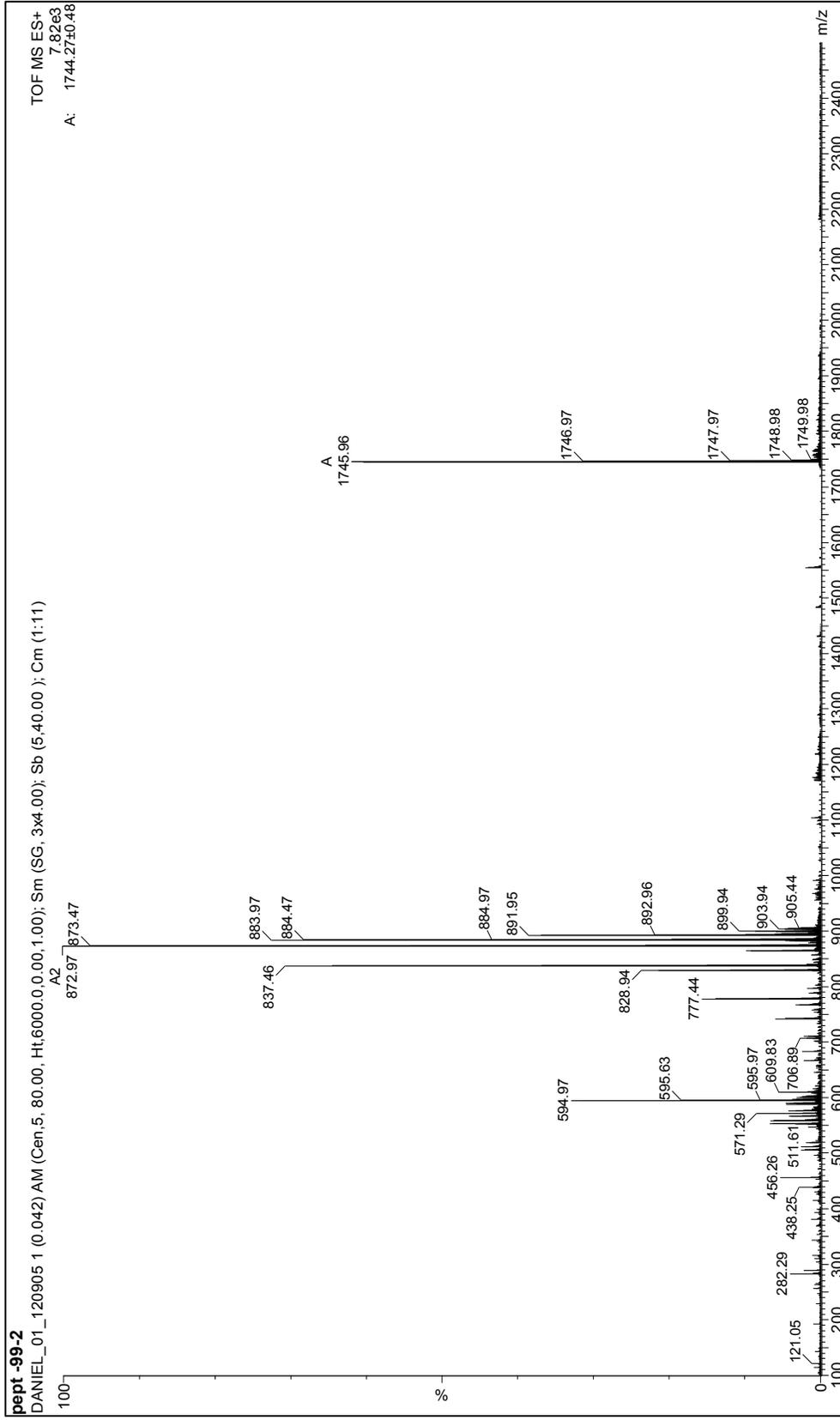


Figura 29: Perfil em espectrômetro de massas do peptídeo 99 depois da purificação em coluna C18.

