

Desenvolvimento de inibidores do fator VIII na hemofilia A

Development of factor VIII inhibitors in hemophilia A

Daniel G. Chaves¹

Cibele V. Rodrigues²

A hemofilia A é uma coagulopatia genética com herança recessiva ligada ao cromossomo X que afeta 1-2 a cada 10 mil indivíduos do sexo masculino nascidos vivos. Estes indivíduos têm baixas concentrações ou ausência do fator VIII (FVIII) da coagulação no plasma e apresentam quadros hemorrágicos leves, moderados e graves, dependendo da atividade de FVIII circulante. Estes pacientes necessitam de constante reposição proteica e aproximadamente 30% deles desenvolvem aloanticorpos contra a proteína exógena. A síntese dos anticorpos anti-FVIII é iniciada quando o FVIII exógeno é endocitado por células apresentadoras de antígeno, degradado e apresentado às células T CD4+ na forma de peptídeos ligados a moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe II. Alguns fatores de risco (paciente/tratamento) podem ser relacionados ao desenvolvimento desta resposta imune. Neste contexto, as mutações no gene do FVIII e polimorfismos em genes envolvidos na resposta imune são candidatos moleculares como determinantes imunogenéticos na predisposição para o desenvolvimento de inibidores. Por não ser completamente entendido e controlado, o desenvolvimento desta resposta imune contra o FVIII constitui o maior problema decorrente do tratamento de indivíduos portadores de hemofilia A e faz-se necessária busca de opções que visem minimizar suas ações deletérias. Algumas alternativas de tratamento têm se mostrado eficazes no tratamento (anti-CD20, plasmaférese, concentrado de complexo protrombínico (PCCs), concentrado de complexo protrombínico ativado (APCCs), fator VII humano ativado), mas a retirada ou neutralização específica dos inibidores de FVIII ainda não foram alcançadas. Rev. Bras. Hematol. Hemoter.

Palavras-chave: Hemofilia A; inibidores; fator VIII; imunologia.

Dentre os distúrbios de coagulação hereditários nas populações humanas destaca-se, por sua gravidade, a hemofilia A (HA), uma coagulopatia recessiva ligada ao cromossomo X causada pela deficiência ou disfunção da glicoproteína plasmática denominada Fator VIII (FVIII). A incidência da HA pode chegar a 1:5.000 meninos nascidos vivos. Nos indivíduos com hemofilia A grave (aproximadamente 50% dos casos; atividade do FVIII < 0,01 U/mL), a hemorragia pode ocorrer espontaneamente, enquanto

pacientes com hemofilia moderada (cerca de 10% dos indivíduos; atividade do FVIII 0,01-0,05 U/mL) apresentam um fenótipo intermediário. Pacientes portadores da forma leve da doença, observada em 30%-40% dos casos (atividade do FVIII 0,05-0,4 U/mL), sofrem de hemorragias pós-trauma ou pós-cirúrgicas.¹ As anormalidades genéticas responsáveis pela hemofilia congênita incluem deleções, inversões (mais frequentemente a inversão do intron 22), mutações sem sentido, mutações de sentido trocado e pequenas deleções no

¹Biólogo. Pesquisador colaborador do Serviço de Pesquisa da Fundação Hemominas – Belo Horizonte-MG.

²Bióloga. Chefe do Setor de Pesquisa da Fundação Hemominas – Belo Horizonte-MG.

Laboratório de Pesquisa, Setor de Pesquisa – Fundação Centro de Hematologia do Estado de Minas Gerais – Hemominas – Belo Horizonte-MG.
Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte-MG.

Correspondência: Daniel Gonçalves Chaves
Laboratório de Pesquisa
Alameda Ezequiel Dias, 321 – Santa Efigênia
30130-110 – Belo Horizonte-MG – Brasil
E-mail: danielgcm@gmail.com
Doi:

gene do FVIII. Sabe-se que a gravidade da doença está relacionada ao tipo de mutação ocorrida no gene do FVIII, sendo que 45% dos pacientes com forma grave apresentam inversão do intron 22, uma vez que nesta mutação o gene é completamente inativado.²

Em adição às artropatias, problemas venosos, hepatites virais e HIV, a formação de anticorpos anti-FVIII é o evento mais complicador no tratamento da HA com concentrados de FVIII. O desenvolvimento de uma resposta imune humoral contra o FVIII ocorre em aproximadamente 25% dos indivíduos com hemofilia A grave e de 5%-15% dos pacientes com hemofilia A leve ou moderada que são tratados com concentrados de FVIII purificados do plasma ou FVIII recombinante.^{3,4} Tais anticorpos anti-FVIII, também chamados inibidores, neutralizam a atividade procoagulante do FVIII no plasma através do bloqueio funcional de epítomos (sítios antigênicos) da proteína. Embora o mecanismo do desenvolvimento dos inibidores não seja completamente entendido, a ocorrência de inibidores reflete uma resposta imune alogênica à administração repetida da proteína exógena. O tratamento de pacientes com inibidores é difícil e pode necessitar de grandes quantidades do fator a um custo considerável. O aumento estimado no custo do e dos cuidados aos pacientes com inibidores é da ordem de 50% no Brasil. O uso de FVIII recombinante é de alto custo (estimado em até US\$100.000/ano/paciente⁵) e, portanto, com limitada acessibilidade aos países em desenvolvimento. Como consequência, hoje, o principal desafio terapêutico é o tratamento de episódios de hemorragia em indivíduos com hemofilia A que se tornam resistentes à terapia de reposição e que desenvolvem anticorpos anti-FVIII humano.

Diagnóstico dos inibidores de FVIII

Embora o paciente que desenvolve inibidores possa não apresentar sintomas, a presença destes anticorpos pode ser descoberta durante a análise clínica rotineira ou, alternativamente, quando algum quadro hemorrágico não é paralisado tão rapidamente como poderia se esperar em resposta ao tratamento com o fator. A presença do inibidor é, geralmente, confirmada usando-se um teste de coagulação sanguínea chamado ensaio de inibidor de Bethesda. A titulação de anticorpos pode ser realizada usando-se este teste e é descrita como o número de unidades Bethesda (UB). Portanto, quanto maior o número de unidades de Bethesda, maior a quantidade de inibidores presentes no plasma. Um paciente é considerado de alto título quando apresenta resposta acima de 5 UB. A presença destes inibidores pode se alterar ao longo do tempo e, em alguns casos, tem sido observado o seu desaparecimento espontâneo dentro de semanas ou meses sem nenhum tratamento aparente.⁶ Esta variação na produção de inibidores pode ser o resultado de vários parâmetros que incluem critérios quantitativos da dosagem do inibidor, tempo decorrido da primeira aparição, a

origem, pureza do produto administrado e o próprio paciente.⁷ Desta forma, fatores de risco podem ser estabelecidos para o desenvolvimento desta resposta imune contra o FVIII.

Imunobiologia dos inibidores do fator VIII

A síntese dos anticorpos anti-FVIII é iniciada quando o FVIII exógeno é endocitado e degradado dentro de uma célula apresentadora de antígenos (APC) e peptídeos ligados a moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe II são apresentados às células T CD4+. Adicionalmente, fragmentos peptídicos de moléculas de FVIII intracelulares, sintetizadas em pequena quantidade pelo paciente, podem ser apresentadas via MHC de classe I. O reconhecimento deste complexo peptídeo/MHC pelas células T induz ativação e expansão clonal. Citocinas secretadas pelo clone de célula T expandido induzem a síntese de anticorpos inibidores do FVIII pelas células B.⁸ Esta resposta imune ao FVIII é considerada policlonal e também heterogênea na sua especificidade.⁹ Os inibidores do FVIII são imunoglobulinas policlonais principalmente da subclasse IgG4, cuja síntese é direcionada por células T CD4+ específicas para o FVIII.¹⁰ Entretanto, subclasses IgG1 e IgG2 estão também usualmente presentes nas populações de anticorpos anti-FVIII. Estes dados sugerem que os inibidores do FVIII estão associados com uma combinação de respostas Th1/Th2.¹¹

Natureza dos anticorpos inibidores do FVIII

Pouco se conhece sobre a etiologia do desenvolvimento dos inibidores de FVIII. No entanto, embora o mecanismo da produção dos anticorpos ainda não esteja completamente elucidado, acredita-se que há dois fatores importantes relacionados ao paciente: tipo de mutação no gene do FVIII e competência da resposta imune. O grupo com maior risco de produzir anticorpos anti-FVIII é aquele em que os indivíduos apresentam maiores alterações no gene, tais como mutações sem sentido, inversões ou grandes deleções,^{12,13} provavelmente devido à ausência de FVIII circulante e à falta de aquisição da tolerância imunológica. A ausência do FVIII impede a seleção das células T auto-reativas no timo que se inicia no final do primeiro trimestre do desenvolvimento embrionário. Como consequência, o FVIII exógeno usado na terapia de reposição na hemofilia A é visto como proteína estranha e desencadeia uma resposta imune.¹⁴ Existe a suspeita de uma interação entre predisposição genética e condições ambientais ou exógenas como fator de risco para desenvolver inibidores. Em resumo, as condições preexistentes as quais parecem influenciar o desenvolvimento de anticorpos incluem: o tipo e a gravidade da hemofilia, a etnia do paciente, o genótipo da hemofilia e o imunofenótipo.¹⁵ A predisposição genética para o desenvolvimento de inibidores anti-FVIII é demonstrada por estudos familiares. Nos regis-

tros da MIBS (*Malmö International Brother Study*) foram encontrados mais membros de uma mesma família com inibidor do que poderia ser explicado por uma chance casual.¹⁶ Semelhantes observações foram feitas em outros relatos.^{17,18} Também o risco para um indivíduo desenvolver inibidores é três vezes maior em famílias com prévia história de inibidores. A concordância geral dentro das famílias é alta, mas há uma clara tendência para os gêmeos mostrarem um grau maior de concordância (68%) que outros membros, indicando a existência de predisposição genética. Fatores ambientais, tais como infecções e o tipo de tratamento, influenciam a resposta imune e, portanto, o risco de desenvolver inibidores em cada família. Entretanto, é improvável que estes fatores não genéticos por si próprios possam explicar a concordância encontrada. A incidência de inibidores é maior em afrodescendentes, o que suporta a teoria de que pessoas deste grupo, por alguma razão, são geneticamente mais predispostas a desenvolver inibidores. Interessantemente, uma maior incidência de outras doenças associadas com defeitos no sistema imune também tem sido reportada em indivíduos negros, tais como lúpus sistêmico eritematoso e alguns tipos de linfoma de célula T não Hodgkin.^{19,20} Os mecanismos subjacentes podem diferir, mas estas observações sugerem que devem haver diferenças fundamentais na resposta imune que podem estar baseadas em marcadores genéticos.

Dentre os fatores de risco não genéticos para desenvolver o inibidor, o mais controverso é o papel do tipo de produto usado no tratamento dos pacientes. Especificamente, é bastante debatido os riscos relativos do FVIII recombinante ou derivado do plasma para induzir a formação do anticorpo.¹⁵ Recentemente, um estudo mostrou que o uso terapêutico de FVIII recombinante aumenta em cerca de 2,4 vezes o risco de desenvolver inibidores se comparado com o uso de FVIII derivado do plasma.²¹ Outras situações ambientais devem modificar a predisposição genética para desenvolver o inibidor: o local de hemorragias frequentes; a coexistência de inflamação; a intensidade de reposição do fator; o estado nutricional.¹⁵ Adicionalmente, o risco de desenvolver inibidores aumenta com o início precoce de terapia com FVIII.

Influência de genes da resposta imune

A resposta imune humoral, responsável pela produção de anticorpos, requer células apresentadoras de antígeno, nas quais peptídeos de antígenos específicos são apresentados na superfície de moléculas MHC aos receptores de células T. Os genes das moléculas de MHC são altamente polimórficos. Por esta razão, a formação de anticorpos inibidores em pacientes com hemofilia A poderia estar associada aos polimorfismos encontrados nestes genes. No entanto, alguns estudos indicam que a resposta imune desses pacientes é fracamente associada aos polimorfismos de MHC²²⁻²⁸ e outros foram inconclusivos. Em outro estudo foi

relatado que, embora o perfil de MHC classe II possa constituir um fator de risco fraco para o desenvolvimento de inibidores, a associação entre MHC e a formação de inibidores de FVIII é diferente entre grupos étnicos.²⁹ 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 no 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 MHC e de citocinas.²⁸ Alguns autores sugerem que o estudo de fatores genéticos relacionados à resposta imune, subpopulações de linfócitos (Th1, Th2) e a caracterização de suas citocinas são linhas de pesquisa relevantes nos pacientes que produzem esses anticorpos anti-FVIII.²⁹

Polimorfismos nos genes de citocinas

O perfil de produção de citocinas tem uma predisposição genética que pode contribuir com as diferenças interindividuais na resposta imune.³⁰⁻³³ Estudos mostraram que polimorfismos na região regulatória e intrônica de várias citocinas estão associados com a produção diferencial destas,³⁴⁻⁴⁰ e que certos polimorfismos estão associados a doenças.⁴¹ Polimorfismos na região promotora podem influenciar a ligação de fatores de transcrição, aumentando ou diminuindo a produção de RNA mensageiro (RNAm) e, então, regulando a produção de citocinas.

Algumas citocinas possuem múltiplos polimorfismos, embora nem todos estejam associados com alterações reais na sua transcrição. Investigações prévias têm demonstrado a associação entre polimorfismos genéticos de citocinas e a aptogênese da doença, incluindo infecções,^{42,43} alergias^{44,45} e doenças autoimunes.^{36,46,47,48}

A interleucina-10 (IL-10) é uma importante citocina pleiotrópica com funções antiinflamatória e estimuladora de linfócitos B. A expressão de IL-10 é altamente controlada. O gene desta citocina (*Gen Bank U16720*) apresenta diferentes haplótipos (IL-10 -1082 G/A, -819 T/C, -592 A/C) associados com baixa ou alta produção da citocina. A produção diferencial de IL-10 está associada a três haplótipos: (GCC/ATA/ACC). Especificamente, o alelo -1082 G está associado a maior produção de IL-10, enquanto o alelo -1082 A está associado a baixos níveis de IL-10. Assim, 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.⁴⁹ Recentemente foi identificada correlação positiva de um microsatélite CA na região promotora do gene de IL-10 com o aumento da produção de inibidores anti-FVIII em pacientes com hemofilia A severa.³⁰ Neste contexto, o nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido

projeto para identificação de polimorfismos em genes de algumas citocinas (IL-4, IL-5, IL-10 e TNF- α) que estejam associados à produção de inibidores de FVIII em pacientes com HA.

Tratamento das crises hemorrágicas na presença do inibidor

Constitui-se um desafio terapêutico tratar episódios hemorrágicos de portadores de hemofilia A que apresentam inibidores. 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 complexo protrombínico ativado (APCCs) podem estimular a formação de um coágulo e parar a hemorragia e superar o requerimento do FVIII.⁵⁰ No entanto, este tipo de terapia apresenta limitações, pois frequentemente pode causar excesso de coagulação. Além disso, estes produtos contêm pequenas quantidades de FVIII e maiores quantidades de FIX, podendo também estimular nova produção de anticorpos tanto para o FVIII na hemofilia A quanto para o FIX na hemofilia B. Alternativamente, a administração de fator VII ativado (FVIIa) humano recombinante (*bypassing agent*) é outra alternativa de terapia para pacientes com inibidor.⁵¹ Este produto tem um curto tempo de ação e múltiplas doses são necessárias a cada 2-4 horas para controlar a hemorragia. Alguns grupos têm relatado o tratamento de pacientes com altos títulos de inibidor (anti-fator V e anti-FVIII) utilizando métodos extracorpóreos de retirada de anticorpos.⁵²⁻⁵⁵ Entretanto, as metodologias de retirada extracorpórea dos inibidores do FVIII não são específicas para estas imunoglobulinas e promovem a retirada de moléculas de anticorpo da circulação importantes para outras respostas imunes. Adicionalmente, em alguns casos, o indivíduo pode perder proteínas plasmáticas essenciais, como a albumina. Além destes tratamentos considerados convencionais, nos últimos anos surgiu a possibilidade de tratamento dos pacientes através de depleção de linfócitos B. Este tratamento foi primeiramente recomendado para pacientes com estágio III-IV de linfoma folicular quimiorresistentes, mas, principalmente em países desenvolvidos, tem sido utilizado para o tratamento de pacientes com hemofilia A e inibidores de FVIII.⁵⁶ A metodologia consiste de infusões intravenosas de rituximab (anticorpos monoclonais anti-CD20) que se liga às células B e iniciam um processo de lise celular (via sistema do complemento ou apoptose).^{57,58} Esta opção de tratamento tem se mostrado bastante eficiente e uma grande quantidade de estudos relaciona a sua eficácia no tratamento de anticorpos inibidores de FVIII em indivíduos com hemofilia adquirida.⁵⁹⁻⁶² Entretanto, notificações de reações adversas relacionadas ao uso do medicamento têm sido emitidas e casos de síndrome de liberação excessiva de citocinas com resultado fatal já foram relatados.⁶³ Desta forma, estudos clínicos ainda devem ser realizados para se obterem mais

informações sobre o uso deste tipo de tratamento neste grupo de indivíduos.

Perspectivas de tratamento

Nas duas últimas décadas, começaram a surgir protocolos que visam à indução de tolerância imune com infusões regulares do FVIII por um período de semanas a anos com ou sem imunossupressão farmacológica.^{64,65} Entretanto, este tipo de tratamento consome tempo e é de alto custo, dificultando sua aplicação em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento.⁶ A redução da concentração de inibidores por plasmaférese tem sido uma tentativa prévia à administração de FVIII na fase aguda da doença. Porém, como já mencionado, este método não tem recebido uma aprovação geral, em parte devido às limitações na quantidade de plasma que pode ser trocado sem a perda de proteínas essenciais.

Embora haja muitas opções terapêuticas e esses tratamentos tenham realmente melhorado o manejo médico da hemofilia em casos em que os inibidores estão presentes, não foi ainda atingido o objetivo principal para a terapia: a neutralização específica da resposta imune ao FVIII ou a eliminação eficiente dos anticorpos do plasma. Portanto, mostra-se crucial a necessidade do desenvolvimento de uma solução terapêutica que extraia do plasma apenas inibidores do FVIII ou iniba sua formação. Recentemente foram descritas experiências baseadas no bloqueio da atividade deletéria dos anticorpos por peptídeos de baixo peso molecular construídos para mimetizar os epítopos reconhecidos pelos anticorpos anti-FVIII na tentativa de restaurar a atividade procoagulante normal por impedir a ligação dos anticorpos ao FVIII.⁷

A respeito da possibilidade de mapear os diferentes epítopos reconhecidos pelos inibidores do FVIII dos pacientes, vários estudos revelaram que o padrão de reatividade do anticorpo é policlonal, direcionado contra múltiplos locais situados no FVIII e único para cada inibidor do plasma investigado.⁶ Todavia, estudos mostraram que os inibidores reconhecem sítios de ligação restritos, predominantemente, nos domínios A2, C2 e A3 da molécula de FVIII. Recentemente, um grupo de pesquisadores atestou, pela técnica de Spot, que a cadeia leve do FVIII é reconhecida por uma variedade maior de anticorpos e sugere que o domínio C1 é o mais imunogênico.^{66,67}

A maioria dos inibidores que reconhecem a cadeia leve da molécula de FVIII se liga ao domínio C2,⁶⁸⁻⁷¹ que possui dois sítios de reconhecimento bem caracterizados. Estes anticorpos impedem a ligação do FVIII ativado ao FvW e aos fosfolipídios de membrana, impedindo a formação do complexo tenaz.⁷² O domínio C2 possui 21 resíduos de aminoácidos que são conhecidos sítios de deleções pontuais responsáveis pela inativação do FVIII sintetizado.⁷³ Além de mutações pontuais, as mutações sem sentido no domínio C2 aumentam em quatro vezes a chance de desenvolvimento de

inibidores (17,7% dos pacientes).⁷⁴ Tal fato sugere que este domínio em particular é mais imunogênico que os demais, principalmente por possuir grandes alças expostas na superfície da molécula.

Como a resposta imune ao FVIII é direcionada principalmente aos epítomos dos domínios A2, C2 e A3 da molécula, é provável que, com um número razoável de peptídeos, seja possível reconstituir o perfil de reatividade dessa resposta imune. Recentemente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu nove peptídeos que mimetizam epítomos na superfície do domínio C2 do FVIII que podem ser reconhecidos pelos inibidores.⁷⁵ Os resultados alcançados evidenciam a importância de pesquisas que visam entender o mecanismo de formação dos inibidores e que possam começar a elucidar uma nova tecnologia para retirada específica dos anticorpos inibidores do FVIII do plasma de pacientes com hemofilia A.

Abstract

Hemophilia A, which affects 1-2:10,000 live-born male neonates, is a genetic coagulopathy with recessive inheritance linked to the X chromosome. These individuals have low concentrations or no coagulation factor VIII (FVIII) in the plasma and suffer from mild, moderate and severe bleeding depending on the circulating FVIII activity. These patients need frequent protein infusions and approximately 30% of them develop alloantibodies against the exogenous protein. Anti-FVIII antibody synthesis initiates when the exogenous FVIII is internalized by antigen presenter cells, degraded and presented to CD4+ T-cells as peptides associated to the class II major histocompatibility complex (MHC). Some risk factors (patient/treatment) may be related to the development of this immune response. Thus, FVIII gene mutations and polymorphisms of genes involved in immune response are molecular candidates of immunogenic determinants in the predisposition for inhibitor development. As it is not fully understood and controlled, the development of immune response against FVIII constitutes a major problem in the treatment of hemophilia A which aims at minimizing the deleterious consequences. Some therapeutic alternatives have been effective (anti-CD20, plasmapheresis, prothrombin complex concentrates, activated prothrombin complex concentrates, human activated factor VII), but removal or neutralization of specific anti-FVIII inhibitors has not been achieved yet. Rev. Bras. Hematol. Hemoter.

Key words: Hemophilia A; inhibitors; factor VIII; immunology.

Referências Bibliográficas

- Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, Horst J, de Moerloose P, Sommer SS, et al. Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study. *Blood*. 1995; 86(6):2206-12.
- Goodeve AC, Peake IR. The molecular basis of hemophilia A: genotype-phenotype relationships and inhibitor development. *Semin Thromb Hemost*. 2003;29(1):23-30.
- Newton-Nash DK, Tollerud D, Guevarra L, Gill JC. Interferon-gamma secretion defects in haemophilia A patients receiving highly purified plasma-derived or recombinant factor VIII. *Br J Haematol*. 1996;95(3):554-60.
- Moreau A, Lacroix-Desmazes S, Stieltjes N, Saenko E, Kaveri SV, D'Oiron R, et al. Antibodies to the FVIII light chain that neutralize FVIII procoagulant activity are present in plasma of nonresponder patients with severe hemophilia A and in normal polyclonal human IgG. *Blood*. 2000;95(11):3435-41.
- Pipe SW, Saint-Remy JM, Walsh CE. New high-technology products for the treatment of haemophilia. *Haemophilia*. 2004;10 Suppl 4:55-63.
- DiMichele DM. Inhibitors in haemophilia: a primer. *Haemophilia*. 2000;6 Suppl 1:38-40.
- Villard S, Piquer D, Raut S, Léonetti JP, Saint-Remy JM, Granier C. Low molecular weight peptides restore the procoagulant activity of factor VIII in the presence of the potent inhibitor antibody ESH8. *J Biol Chem*. 2002;277(30):27232-9.
- Rick ME, Walsh CE, Key NS. Congenital bleeding disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003:559-74.
- Gilles JG, Arnout J, Vermynen J, Saint-Remy JM. Anti-factor VIII antibodies of hemophiliac patients are frequently directed towards nonfunctional determinants and do not exhibit isotypic restriction. *Blood*. 1993;82(8):2452-61.
- Reding MT, Okita DK, Diethelm-Okita BM, Anderson TA, Conti-Fine BM. Human CD4+ T-cell epitope repertoire on the C2 domain of coagulation factor VIII. *J Thromb Haemost*. 2003; 1(8):1777-84.
- Lollar P. Pathogenic antibodies to coagulation factors. Part one: factor VIII and factor IX. *J Thromb Haemost*. 2004;2(7):1082-95.
- Schwaab R, Brackmann HH, Meyer C, Seehafer J, Kirchgesser M, Haack A, et al. Hemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. *Thromb Haemost*. 1995;74(6):1402-6.
- Tuddenham EG, McVey JH. The genetic basis of inhibitor development in haemophilia A. *Haemophilia*. 1998;4(4):543-5.
- White GC 2nd, Kempton CL, Grimsley A, Nielsen B, Roberts HR. Cellular immune responses in hemophilia: why do inhibitors develop in some, but not all hemophiliacs? *J Thromb Haemost*. 2005;3(8):1676-81.
- DiMichele D. Inhibitors: resolving diagnostic and therapeutic dilemmas. *Haemophilia*. 2002;8(3):280-7.
- Astermark J, Berntorp E, White GC, Kroner BL; MIBS Study Group. The Malmö International Brother Study (MIBS): further support for genetic predisposition to inhibitor development in hemophilia patients. *Haemophilia*. 2001;7(3):267-72.
- Frommel D, Allain JP. Genetic predisposition to develop factor VIII antibody in classic hemophilia. *Clin Immunol Immunopathol*. 1977;8(1):34-8.
- Vermynen J. How do some haemophiliacs develop inhibitors? *Haemophilia*. 1998;4(4):538-42.
- Eti E, Hayem G, De Bandt M, Tubach F, Palazzo E, Kahn MF, et al. SLE in black patients from Africa and the French West Indies. Spectrum and race differences. *Clin Exp Rheumatol*. 1998; 16(6): 762-3.
- Groves FD, Linet MS, Travis LB, Devesa SS. Cancer surveillance series: non-Hodgkin's lymphoma incidence by histologic subtype in the United States from 1978 through 1995. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(15):1240-51.
- Goudemand J, Rothschild C, Demiguel V, Vinciguerrat C, Lambert T, Chambost H, et al. Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. *Blood*. 2006; 107(1):46-51.

22. Nuñez-Roldan A, Arnaiz-Villena A, Nuñez-Ollero G. Genetic control by the HLA region of the immune response to factor VIII in hemophilic patients. *C R Seances Acad Sci D*. 1979;288(23):1719-20.
23. Mayr WR, Lechner K, Niessner H, Pabinger-Fasching I. HLA-DR and factor VIII antibodies in hemophilia A. *Thromb Haemost*. 1984;51(2):293.
24. 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*. 1985;25(4):216-9.
25. Papasteriades C, Varla M, Economidou J, Marcakis K, Mitsouli C, Louisou K, et al. High frequency of HLA-DR5 in Greek patients with haemophilia A and haemophilia B. *Tissue Antigens*. 1986;28(2):84-7.
26. Aly AM, Aledort LM, Lee TD, Hoyer LW. Histocompatibility antigen patterns in haemophilic patients with factor VIII antibodies. *Br J Haematol*. 1990;76(2):238-41.
27. Lippert LE, Fisher LM, Schook LB. Relationship of major histocompatibility complex class II genes to inhibitor antibody formation in hemophilia A. *Thromb Haemost*. 1990;64(4):564-8.
28. Oldenburg J, Picard JK, Schwaab R, Brackmann HH, Tuddenham EG, Simpson E. HLA genotype of patients with severe haemophilia A due to intron 22 inversion with and without inhibitors of factor VIII. *Thromb Haemost*. 1997;77(2):238-42.
29. Tizzano EF, Cornet M, Domènech M, Baiget M. Modifier genes in haemophilia: their expansion in the human genome. *Haemophilia*. 2002;8(3):250-4.
30. Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, Lefvert AK; MIBS Study Group. Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood*. 2006;107(8):3167-72.
31. Awad MR, Webber S, Boyle G, Sturchio C, Ahmed M, Martell J, et al. The effect of cytokine gene polymorphisms on pediatric heart allograft outcome. *J Heart Lung Transplant*. 2001;20(6):625-30.
32. Bathgate AJ, Pravica V, Perrey C, Therapondos G, Plevris JN, Hayes PC. The effect of polymorphisms in tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, and transforming growth factor-beta1 genes in acute hepatic allograft rejection. *Transplantation*. 2000;69(7):1514-7.
33. Aziz T, Hasleton P, Hann AW, Yonan N, Deiraniya A, Hutchinson IV. Transforming growth factor beta in relation to cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000;119(4 Pt 1):700-8.
34. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet*. 1992;1(5):353.
35. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*. 1997;24(1):1-8.
36. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms 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. *J Clin Invest*. 1998;102(7):1369-76.
37. Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *Eur J Immunogenet*. 1999;26(1):1-3.
38. Hutchinson IV, Turner D, Sankaran D, Awad M, Pravica V, Sinnott P. Cytokine genotypes in allograft rejection: guidelines for immunosuppression. *Transplant Proc*. 1998;30(8):3991-2.
39. Hutchinson IV, Turner DM, Sankaran D, Awad MR, Sinnott PJ. Influence of cytokine genotypes on allograft rejection. *Transplant Proc*. 1998;30(3):862-3.
40. Sankaran D, Asderakis A, Ashraf S, Roberts IS, Short CD, Dyer PA, et al. Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. *Kidney Int*. 1999;56(1):281-8.
41. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes Immun*. 1999;1(1):3-19.
42. Nadel S, Newport MJ, Booy R, Levin M. Variation in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease. *J Infect Dis*. 1996;174(4):878-80.
43. Liu Z, Colpaert S, D'Haens GR, Kasran A, de Boer M, Rutgeerts P, et al. Hyperexpression of CD40 ligand (CD154) in inflammatory bowel disease and its contribution to pathogenic cytokine production. *J Immunol*. 1999;163(7):4049-57.
44. Hobbs K, Negri J, Klinnert M, Rosenwasser LJ, Borish L. Interleukin-10 and transforming growth factor-beta promoter polymorphisms in allergies and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158(6):1958-62.
45. Moffatt MF, Cookson WO. Tumour necrosis factor haplotypes and asthma. *Hum Mol Genet*. 1997;6(4):551-4.
46. Lazarus M, Hajeer AH, Turner D, Sinnott P, Worthington J, Ollier WE, et al. Genetic variation in the interleukin 10 gene promoter and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 1997;24(12):2314-7.
47. Rood MJ, van Krugten MV, Zanelli E, van der Linden MW, Keijsers V, Schreuder GM, et al. TNF-308A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2000;43(1):129-34.
48. 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*. 1997;49(6):635-9.
49. Wu JM, Bensen-Kennedy D, Miura Y, Thoburn CJ, Armstrong D, Vogelsang GB, et al. The effects of interleukin 10 and interferon gamma cytokine gene polymorphisms on survival after autologous bone marrow transplantation for patients with breast cancer. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11(6):455-64.
50. Yoshioka A, Kamisue S, Tanaka I, Kato M, Kohmura I, Shima M, et al. Anamnestic response following infusion of prothrombin complex concentrates (PCC) and activated prothrombin complex concentrates (APCC) in haemophilia A patients with inhibitors. *Blood*. v.2, p.51-58, 1991.
51. Green D. Complications associated with the treatment of haemophiliacs with inhibitors. *Haemophilia*. 1999;5 Suppl 3:11-7.
52. Tribl B, Knöbl P, Derfler K, Kapiotis S, Aspöck G, Jäger U, et al. Rapid elimination of a high-titer spontaneous factor V antibody by extracorporeal antibody-based immunoadsorption and immunosuppression. *Ann Hematol*. 1995;71(4):199-203.
53. Jansen M, Schmaldienst S, Banyai S, Quehenberger P, Pabinger I, Derfler K, et al. Treatment of coagulation inhibitors with extracorporeal immunoadsorption (Ig-Therasorb). *Br J Haematol*. 2001;112(1):91-7.
54. Francesconi M, Korninger C, Thaler E, Niessner H, Höcker P, Lechner K. Plasmapheresis: its value in the management of patients with antibodies to factor VIII. *Haemostasis*. 1982;11(2):79-86.
55. Sunagawa T, Uezu Y, Kadana K, Tokuyama K, Kinjo F, Saito A. Successful treatment of a non-hemophilic patient with inhibitor to factor VIII by double-filtration plasmapheresis. *Br J Haematol*. 1999;104(3):465-7.

56. Kessel C, Königs C, Linde R, Escuriola-Ettinghausen C, Stoll H, Klingebiel T, *et al.* Humoral immune responsiveness to a defined epitope on factor VIII before and after B cell ablation with rituximab. *Mol Immunol.* 2008;46(1):8-15.
57. Wiestner A, Cho HJ, Asch AS, Michelis MA, Zeller JA, Peerschke EI, *et al.* Rituximab in the treatment of acquired factor VIII inhibitors. *Blood.* 2002;100(9):3426-8.
58. Dunkley S, Kershaw G, Young G, Warburton P, Lindeman R, Matthews S, *et al.* Rituximab treatment of mild haemophilia A with inhibitors: a proposed treatment protocol. *Haemophilia.* 2006;12(6):663-7.
59. Barnett B, Kruse-Jarres R, Leissing CA. Current management of acquired factor VIII inhibitors. *Curr Opin Hematol.* 2008;15 (5): 451-5.
60. Franchini M, Lippi G. Acquired factor VIII inhibitors. *Blood.* 2008;112(2):250-5.
61. Santoro C, Rago A, Biondo F, De Propriis MS, De Vellis A, Guarini A, *et al.* Efficacy of rituximab treatment in postpartum acquired haemophilia A. *Haemophilia.* 2008;14(1):147-9.
62. Alvarado Y, Yao X, Jumper C, Hardwicke F, D'Cunha N, Cobos E. Acquired hemophilia: a case report of 2 patients with acquired factor VIII inhibitor treated with rituximab plus a short course of steroid and review of the literature. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2007;13(4):443-8.
63. Wathion N. Mabthera (Rituximab) - Reports of adverse reactions - New recommendations for use. Press Release - The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. 1998. Available from: URL: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/press/pr/4053298en.pdf>
64. Orsini F, Rotschild C, Beurrier P, Faradji A, Goudemand 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.* 2005; 90(9):1288-90.
65. Rocino A, Santagostino E, Mancuso ME, Mannucci PM. Immune tolerance induction with recombinant factor VIII in hemophilia A patients with high responding inhibitors. *Haematologica.* 2006; 91(4):558-61.
66. Kopecky EM, Greinstetter S, Pabinger I, Buchacher A, Römisch J, Jungbauer A. Combinatorial peptides directed to inhibitory antibodies against human blood clotting factor VIII. *Thromb Haemost.* 2005;94(5):933-41.
67. Kopecky EM, Greinstetter S, Pabinger I, Buchacher A, Römisch J, Jungbauer A. Mapping of FVIII inhibitor epitopes using cellulose-bound synthetic peptide arrays. *J Immunol Methods.* 2006;308(1-2):90-100.
68. Shima M, Scandella D, Yoshioka A, Nakai H, Tanaka I, Kamisue S, *et al.* 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. *Thromb Haemost.* 1993;69(3): 240-6.
69. Shima M, Nakai H, Scandella D, Tanaka I, Sawamoto Y, Kamisue S, *et al.* Common inhibitory effects of human anti-C2 domain inhibitor alloantibodies on factor VIII binding to von Willebrand factor. *Br J Haematol.* 1995;91(3):714-21.
70. Scandella D, Gilbert GE, Shima M, Nakai H, Eagleson C, Felch M, *et al.* 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.* 1995; 86(5):1811-9.
71. Healey JF, Barrow RT, Tamim HM, Lubin IM, Shima M, Scandella D, *et al.* Residues Glu2181-Val2243 contain a major determinant of the inhibitory epitope in the C2 domain of human factor VIII. *Blood.* 1998;92(10):3701-9.
72. Jacquemin MG, Desqueper BG, Benhida A, Vander Elst L, Hoylaerts MF, Bakkus M, *et al.* Mechanism and kinetics of factor VIII inactivation: study with an IgG4 monoclonal antibody derived from a hemophilia A patient with inhibitor. *Blood.* 1998;92 (2): 496-506.
73. Fijnvandraat K, Bril WS, Voorberg J. Immunobiology of inhibitor development in hemophilia A. *Semin Thromb Hemost.* 2003;29(1):61-8.
74. Oldenburg J, El-Maarri O, Schwaab R. Inhibitor development in correlation to factor VIII genotypes. *Haemophilia.* 2002;8 Suppl 2:23-9.
75. Chaves DG, Velloso-Rodrigues C, Moreau V, Nguyen C, Villard S, Belisário AR, *et al.* Reactivity profile of anti-factor VIII antibodies with designed synthetic peptides mimicking epitopes of the C2 and a1 domains. *Br J Haematol.* 2008;141(5):708-15.

Suporte Financeiro: Capes, Fapemig, Fundação Hemominas.

Avaliação: Editor e dois revisores externos

Recebido: 06/10/2008

Aceito após modificações: 17/12/2008