

## Farmacogenética do desenvolvimento de anticorpos inibidores do fator VIII na hemofilia A

Pharmacogenetics of development of inhibitory antibodies to factor VIII hemophilia A

**Thiago Barbosa de Souza<sup>1,2</sup>, Laura Pessanha Duarte<sup>3</sup>, João Tadeu Damian Souto Filho<sup>3,4</sup>, Jorge Hernandez Fernandez<sup>5</sup>, Enrique Medina-Acosta<sup>2,6</sup>**

<sup>1</sup> Curso de Farmácia, Universidade Estácio de Sá, Avenida 28 de Março 423, Centro, Campos dos Goytacazes, RJ, CEP 28020-740, Brasil

<sup>2</sup> Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Avenida Alberto Lamego 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ, CEP 28013-602, Brasil

<sup>3</sup> Hemocentro Regional de Campos do Hospital Ferreira Machado, Rua Rocha Leão 2 Campos dos Goytacazes, RJ, CEP 25051-170, Brasil

<sup>4</sup> Faculdade de Medicina de Campos, Avenida Doutor Alberto Torres 217, Centro, Campos dos Goytacazes, RJ, CEP 28035-580, Brasil

<sup>5</sup> Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Avenida Alberto Lamego 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ, CEP 28013-602, Brasil

<sup>6</sup> Hospital Escola Álvaro Alvim, Rua Barão da Lagoa Dourada 409, Pelinca, Campos dos Goytacazes, RJ, CEP 28035-010, Brasil

### RESUMO

A complicação mais séria da terapia de reposição do fator VIII (FVIII) nos pacientes com Hemofilia A é o desenvolvimento de aloanticorpos ou autoanticorpos inibidores. Os anticorpos inibidores impedem hemostasia efetiva, representando risco real para episódios hemorrágicos de difícil controle. Esta revisão aborda os conceitos pertinentes e cobre os seguintes aspectos farmacogenéticos do desenvolvimento de anticorpos inibidores: tipos de anticorpos, mecanismos de inibição, diagnóstico, fatores genéticos e não-genéticos de risco, alternativas de tratamento e de intervenção.

**Palavras chave:** fator VIII; hemofilia A; inibidores; resposta imune.

### ABSTRACT

The most serious complication of factor VIII (FVIII) replacement therapy in patients with hemophilia A is the development of inhibitory alloantibodies or autoantibodies. The inhibitory antibodies impair effective hemostasis, representing real risk for hemorrhagic episodes difficult to control. This revision addresses the pertinent concepts, and covers the following pharmacogenetic aspects of the development of inhibitory antibodies: antibody types, inhibitory mechanisms, diagnostics, genetic and non-genetic risks factors, alternatives of treatment and intervention.

**Keywords:** factor VIII; hemophilia A; inhibitors; immune response

Autor para correspondência:

Enrique Medina-Acosta, Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular (NUDIM), sede Hospital Escola Álvaro Alvim, Rua Barão da Lagoa Dourada 409, Prédio novo, 1o andar, Pelinca, Campos dos Goytacazes CEP 28035-010, Tel/Fax: (022) 2726 6758; E-mail: [quique@uenf.br](mailto:quique@uenf.br)

## INTRODUÇÃO

A hemofilia A é um distúrbio de coagulação, com herança recessiva ligada ao cromossomo X, podendo afetar um indivíduo a cada 10.000 nascidos vivos do sexo masculino. É causada por mutações no gene F8 que codifica o fator de coagulação VIII (FVIII), uma glicoproteína essencial à cascata de coagulação sanguínea. As mutações no gene F8 incluem inversões, deleções, inserções, mutações sem sentido e de sentido trocado. Elas ocasionam a deficiência ou disfunção do FVIII.<sup>1</sup> A gravidade da hemofilia A depende do nível residual do fator VIII presente no plasma (FVIII:Ag) e de sua atividade funcional (FVIII:C). Assim, é classificada em hemofilia grave (FVIII:Ag < 0,01 UI/ml; FVIII:C < 1%), na qual podem ocorrer sangramentos espontâneos, hemofilia moderada (FVIII:Ag > 0,01 UI/ml e < 0,05 UI/ml; 1% < FVIII:C < 5%) com fenótipo intermediário e hemofilia leve (FVIII:Ag > 0,05 UI/ml e < 0,40 UI/ml; 5% < FVIII:C < 50%), em que os portadores sofrem de hemorragia pós-traumas ou pós-cirúrgicas.<sup>1</sup> Hemofilia A dos tipos grave, moderado e leve ocorre com frequências de 50%, 10% e 40%, respectivamente.

As principais manifestações clínicas da hemofilia A são sangramentos, que podem ocorrer devido a traumas, procedimentos cirúrgicos ou de forma espontânea. As hemorragias podem se apresentar sob a forma de hematúria, epistaxe, melena/hematêmese, mas frequentemente se apresentam como hematomas e hemartroses (sangramentos intra-articulares).<sup>2</sup> A terapia padrão consiste na infusão intravenosa de FVIII, proveniente de derivados de plasma ou de produtos recombinantes.<sup>3</sup>

Apesar do seu reconhecido benefício para a maioria dos pacientes, há a possibilidade de resistência à terapêutica.<sup>3</sup> Essa resistência se inicia com a produção de aloanticorpos e é desencadeada quando a proteína exógena é reconhecida como antígeno pelo sistema imunológico do paciente. O desenvolvimento de anticorpos contra o FVIII representa um dos principais desafios ao tratamento de hemofílicos do tipo A. Diversos fatores intrínsecos e extrínsecos de risco para o desenvolvimento de inibidores têm sido identificados. Entre os fatores intrínsecos associados com maior predisposição estão mutações causadoras de hemofilia A e alguns polimorfismos em genes da resposta imune. Desta forma, verifica-se o caráter poligênico que envolve o fenômeno de desenvolvimento de inibidores. Os fatores extrínsecos são referentes ao tipo de FVIII administrado na terapia.<sup>4</sup> Todos esses agravantes, combinados ou não, culminam na maior susceptibilidade ao desenvolvimento de inibidores, que tornam a terapia ineficiente e de reduzida custo-efetividade para uma significativa parcela dos pacientes.<sup>4</sup>

Neste artigo são revisados os conceitos e os seguintes aspectos farmacogenéticos do desenvolvimento de anticorpos inibidores: tipos de anticorpos, mecanismos de inibição, diagnóstico, fatores genéticos e não-genéticos de risco, alternativas de tratamento e de intervenção.

## A CASCATA DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA: ASPECTOS GERAIS

A coagulação do sangue resulta de uma complexa reação

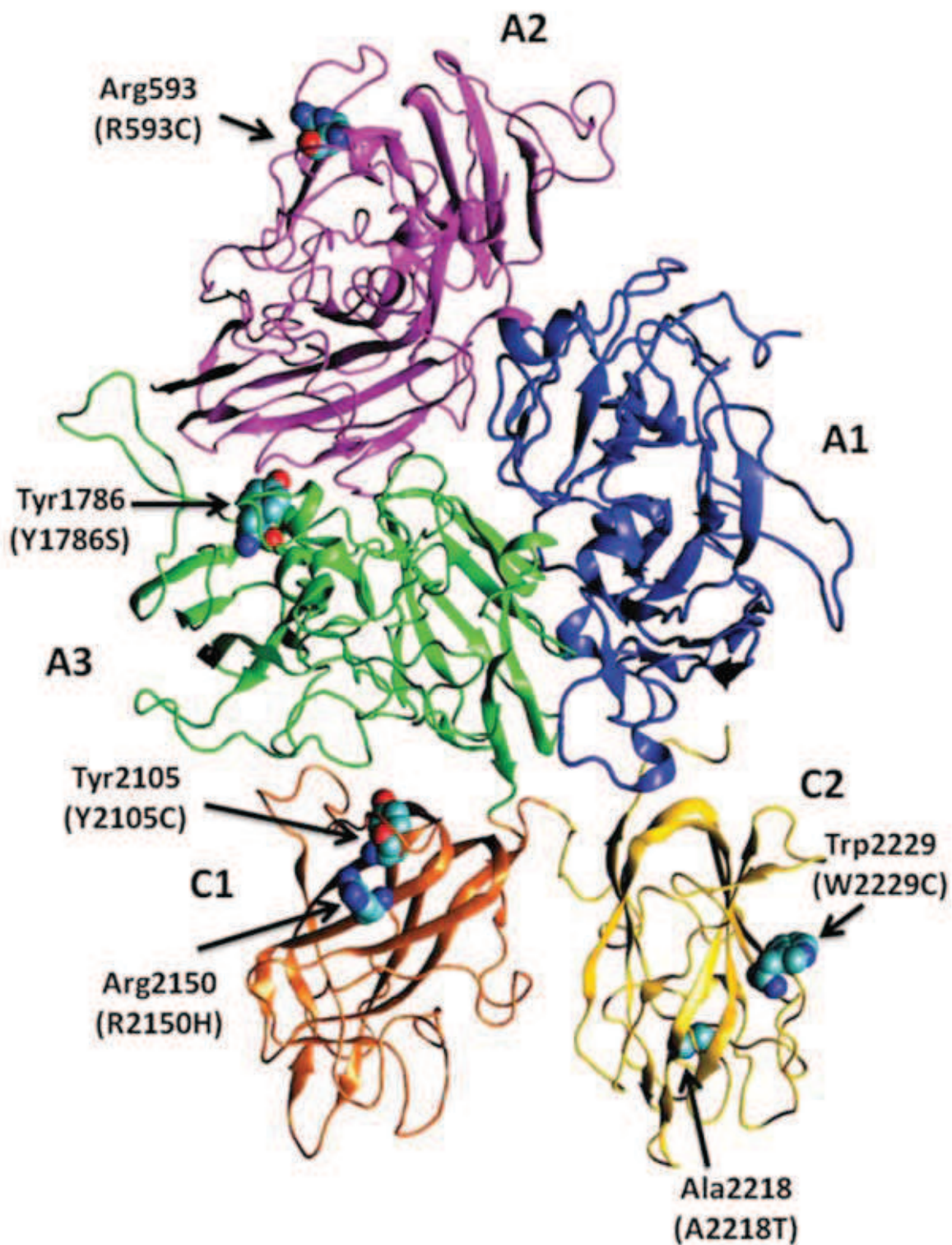
em cascata envolvendo diversas moléculas. As proteínas participantes desse processo, comumente designadas de fatores de coagulação, exercem papel crucial na formação da fibrina, proteína que é o principal componente do coágulo.<sup>1</sup> Deficiências desses fatores, seja quantitativas ou funcionais, caracterizam diversas coagulopatias, ocasionando quadros hemorrágicos.

A cascata de coagulação se inicia com a expressão do fator tecidual (FT) e sua exposição ao espaço intravascular. FT, sob condições normais, não é expresso por células do sangue, como os monócitos e pelas células endoteliais. A sua expressão ocorre quando há lesões ou em casos de endotoxemia.<sup>5</sup> FT funciona como receptor para o fator VII (FVII) de coagulação, formando o complexo FT-FVIIa, que por sua vez cliva os fatores IX e X, gerando as formas ativas FIXa e FXa, respectivamente. Subsequentemente há formação de trombina, responsável pela formação de fibrina, a partir do fibrinogênio.<sup>5</sup> Todavia, a quantidade de trombina gerada é mínima, sendo necessárias outras vias.<sup>6</sup> A trombina gerada nesse processo ativa o fator V (FVa) e o FVIII (FVIIIa). Essas reações são essenciais para a formação do complexo tenase intrínseco (FIXa/FVIIIa), que converte o fator X em FXa, e para a formação do complexo protrombinase (FVa/FXa), que converte a protrombina em trombina; ambos os complexos são dependentes de íons Ca<sup>2+</sup>.<sup>7</sup> A ativação do FX é cerca de 50 vezes maior com o complexo FIXa/FVIIIa do que com o complexo FT-FVIIa, realçando a importância da via dependente do complexo tenase.<sup>6</sup> Todos esses eventos ocorrem sobre membranas fosfolipídicas, principalmente de plaquetas ativadas, que expressam sítios de ligação para os complexos tenase e protrombinase. A trombina gerada por ambas as vias converte o fibrinogênio em fibrina, promovendo agregação plaquetária e ativação do fator XIII (FXIII), cuja função é estabilizar o coágulo de fibrina.<sup>7</sup>

## FVIII e sua importância na cascata de coagulação

FVIII é codificado pelo gene F8, com 186kb de comprimento e 26 exons, e está localizado na região Xq28.<sup>8</sup> A proteína precursora do FVIII consiste de 2351 aminoácidos, sendo que os 19 primeiros correspondem a uma sequência de peptídeo sinal. Quando a proteína passa pelo retículo endoplasmático, o peptídeo sinal é clivado resultando em uma proteína de estrutura primária de 2332 aminoácidos. A análise dessa estrutura primária revelou 3 tipos de domínios estruturais diferentes, sendo três domínios A, com 330 aminoácidos, um domínio B (com 980 aminoácidos) e uma região carboxiterminal com 150 aminoácidos, divididos em dois domínios C, na seguinte ordem: A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2.<sup>9</sup> Os domínios A possuem homologia de cerca de 30% entre si, além de alta homologia à ceruloplasmina, uma enzima transportadora de cobre. São limitados por espaçadores curtos que consistem em regiões ricas em resíduos de ácido aspártico e glutâmico (regiões a1, a2 e a3).<sup>9</sup> A **figura 1** mostra uma representação tridimensional em fita da estrutura da proteína FVIII humana sem o domínio B, com os principais resíduos envolvidos no desenvolvimento de anticorpos inibidores.

O domínio B apresenta vários sítios de glicosilação e não apresenta homologia com estruturas conhecidas. Sua função



**Figura 1.** Representação tridimensional em fita da estrutura da proteína FVIII humana sem o domínio B. Modelo composto por 5 domínios globulares, baseado no número de acesso 3CDZ do Molecular Modeling Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=63538>) e editada pelo programa VMD versão 1.8.6.42 Os domínios A1, A2, A3, C1 e C2 estão representados em azul, rosa, verde, laranja e amarelo, respectivamente. Em destaque e indicados por setas, mutações R593C, Y1786S, Y2105C, R2150H, A2218T e W2229C relacionadas ao risco de desenvolvimento de anticorpos inibidores.

ainda não está clara, mas parece estar relacionada à secreção do FVIII.<sup>10,11</sup>

Os domínios C1 e C2 apresentam homologia à lectina discoidina I e ao ligante de lipídeos de aglutinina. O domínio C2 contém sítios de ligação para fosfolipídios e para o fator Von Willebrand (FvW).<sup>12</sup>

FVIII é produzido principalmente pelos hepatócitos. Sua maturação e secreção envolvem diversas modificações pós-traducionais. Após passar por N-glicosilações no retículo endoplasmático, sofre processos de sulfatação e O-glicosilações em resíduos específicos, além de passar por clivagens proteolíticas entre os domínios B e A3, e em outros sítios do domínio B. Dessa forma, FVIII é dividido em duas porções distintas, consistindo em uma cadeia leve (a3-A3-C1-C2) e outra pesada (A1-a1-A2-a2-B) contendo fragmentos heterogêneos do domínio B.<sup>13</sup> FVIII secretado é um heterodímero, cujas cadeias se mantêm ligadas através de interações não covalentes entre os domínios A1 e A3, juntamente a íons Cu<sup>2+</sup>.<sup>9</sup>

O heterodímero do FVIII, após secreção, interage com o FvW via domínios C2 e a3,<sup>14</sup> que além de transportar o FVIII no plasma aumenta sua estabilidade para uma meia vida que varia entre 12-16 horas. Além disso, o FvW favorece a clivagem do FVIII pela trombina.<sup>14</sup>

FVIII apresenta atividade procoagulante máxima após ativação pela trombina. Sua ativação é resultante da clivagem nos resíduos Arg372 e Arg740 da cadeia pesada e Arg 1689 da cadeia leve.<sup>12</sup> Essas clivagens geram um heterotrímero A1/A2/A3-C1-C2, cujas cadeias permanecem associadas por interações entre os domínios A1 e A3. Mediante esse processamento a afinidade com o FvW é reduzida, e o FVIIIa fica livre.<sup>15</sup> FVIIIa forma o complexo tenase, juntamente ao FIXa e às membranas fosfolipídicas carregadas negativamente e íons cálcio. Esse complexo converte o FX para sua forma ativa, este por sua vez convertendo a protrombina em trombina, levando à formação de fibrina.<sup>6</sup>

FVIII é rapidamente inativado por duas vias distintas. Uma delas é a dissociação espontânea. Sua instabilidade intrínseca pode ser atribuída à baixa força de interação entre o domínio A2 e o dímero A1/A3-C1-C2. A outra via de inativação do FVIII é a degradação proteolítica, que envolve clivagens na cadeia pesada em Arg336 e Arg562. Essas clivagens podem ser realizadas pelos fatores IXa, Xa e proteína C ativa, PCA.<sup>16</sup>

### Diagnóstico de inibidores

Os anticorpos inibidores ocorrem em cerca de 20 a 30% dos portadores de hemofilia A grave e de 10 a 15% dos portadores da forma leve ou moderada da doença.<sup>4,17</sup>

A presença de inibidores manifesta-se clinicamente pelo aumento da tendência ao sangramento, ocorrência de episódios hemorrágicos de difícil controle, redução da resposta ou eficácia do tratamento habitual e aumento do consumo do concentrado do FVIII.<sup>18</sup> Em crianças, o diagnóstico é mais difícil, pois os sinais são menos evidentes.<sup>18</sup>

Os inibidores surgem após as primeiras infusões em até 150 dias de exposição ao FVIII exógeno.<sup>19</sup> A presença de inibidores é usualmente detectada pelo teste de coagulação sanguínea

conhecido como ensaio de inibidor de Bethesda, descrito inicialmente por Kasper e cols. em 1975 e recentemente modificado pelo protocolo de Nijmegen, sendo o mais utilizado e recomendado pela Federação Mundial de Hemofilia.<sup>18</sup> Esse método consiste na adição à amostra do paciente de um mesmo volume de pool de plasma normal contendo como tampão e estabilizador o imidazol. Por esse teste, os inibidores podem ser quantificados e descritos em número de unidades Bethesda (UB). Uma UB corresponde à quantidade de anticorpos inibidores capaz de neutralizar 50% da atividade de FVIII plasmático.<sup>18</sup> Assim, quanto maior o número de unidades Bethesda maior a quantidade de inibidores presentes no plasma do paciente. Indivíduos com >5UB são considerados portadores de alto título de inibidores. Valores inferiores são considerados de baixo título.<sup>20</sup> Pode haver variação com o decorrer do tempo na quantidade de inibidores, os mesmos podendo chegar a desaparecer por completo dentro de semanas ou meses sem novas reposições. Apesar do largo uso e aceitação, esse método de quantificação e detecção de inibidores apresenta limitações. Níveis baixos de inibidores são dificilmente detectados, além de não existirem padrões de referência para a dosagem de anticorpos, devido à alta variabilidade interlaboratorial.<sup>19</sup>

### Imunologia e natureza dos anticorpos inibidores

Observações oriundas de estudos prospectivos<sup>21-24</sup> demonstram os seguintes fatos em relação ao surgimento de anticorpos inibidores:

- (a) Inibidores ocorrem com maior frequência em pacientes com hemofilia A severa, isto é, em pacientes com níveis basais de FVIII <0.01 U/mL;
- (b) Inibidores se desenvolvem com maior frequência poucos dias (mediana de 9 a 11) após exposição ao FVIII;
- (c) Inibidores se desenvolvem mais frequentemente durante a infância;
- (d) Alguns pacientes são muito respondedores e apresentam resposta anamnésica rápida e enérgica ao FVIII, enquanto outros são pouco respondedores e desenvolvem baixos níveis de inibidores.

A produção de inibidores do FVIII é iniciada quando as células apresentadoras de antígenos endocitam o FVIII exógeno e o degradam em peptídeos, que por sua vez se ligam a moléculas do complexo maior de histocompatibilidade humano (HLA) de classe II, sendo exibidos na superfície das células apresentadoras de antígenos e assim apresentados às células T CD4<sup>+</sup>.<sup>25</sup> Em adição, fragmentos peptídicos do FVIII endógeno produzidos em pequena escala pelo paciente hemofílico podem ser apresentados às células T CD8<sup>+</sup> via HLA classe I, induzindo ativação e expansão clonal do linfócito T ativado. Células T estimulam os linfócitos B a produzir anticorpos inibidores do FVIII. Os inibidores do FVIII pertencem principalmente à subclasse IgG4, com síntese direcionada por células T CD4<sup>+</sup> específicas. Secundariamente são encontradas subclasses de IgG1 e IgG2 sugerindo que o fenômeno de formação de inibidores envolve uma associação de respostas Th1 e Th2.<sup>26</sup> As citocinas secretadas Th2 (como a IL-4 e a IL-10) promovem a síntese de anticorpos pelos linfócitos B.

### Mecanismos de inibição por anticorpos anti-FVIII

A resposta imune ao FVIII é policlonal.<sup>26</sup> Os anticorpos exercem sua atividade inibitória pelo bloqueio ou neutralização funcional do FVIII infundido. Embora os mecanismos de inibição da proteína exógena ainda não tenham sido completamente elucidados, existem proposições e estudos revelando parte do que ocorre. Anticorpos que se ligam ao domínio A2 do FVIII causam impedimento estérico do sítio de clivagem pela trombina, reduzindo o nível de FVIIIa. Anticorpos dirigidos contra o domínio A3 impedem a ligação do FVIIIa ao FIXa.<sup>27</sup> Os que se ligam ao domínio C2 impedem a ligação do FVIII aos fosfolípidios de membrana, bem como ao FvW, visto que esse domínio apresenta sítios para ambas as ligações.<sup>28</sup> A ligação normal entre o FVIII e o FvW pode formar epítomos e conseqüentemente se tornar alvo de inibidores. Esses anticorpos impedem a dissociação de ambos os fatores quando o FVIII é clivado pela trombina, diminuindo a quantidade de FVIIIa livre. Também há relatos de anticorpos IgG anti-FVIII com atividade FVIII-proteolítica.<sup>29</sup> Na hemofilia adquirida, os inibidores são auto-anticorpos anti-FVIII endógeno.<sup>29</sup>

### Fatores de risco

Diversos fatores têm sido associados ao risco de desenvolvimento de inibidores. Os mais frequentemente citados são: tipo de mutação no gene F8, polimorfismos em genes da resposta imune, histórico familiar, fatores étnicos, fatores relacionados ao tratamento, como o tipo de FVIII administrado.<sup>30</sup>

### Tipo de mutação no gene F8 e o desenvolvimento de inibidores

É importante levar em consideração que a própria mutação causadora da hemofilia está relacionada ao desenvolvimento de inibidores. As mutações em que é maior a frequência de inibidores são as que levam a grandes alterações funcionais na proteína FVIII ou à sua completa ausência, tais como mutações sem sentido, grandes deleções ou inversões. Entre 30 e 40% dos pacientes com largas mutações sem sentido ou com grandes deleções, respectivamente, desenvolvem inibidores.<sup>31</sup> A inversão envolvendo o intron 22, a causa mais frequente de hemofilia A, constitui a terceira classe de mutações mais frequentemente associadas com a produção de inibidores. Na hemofilia A das formas leve e moderada causadas por mutações de sentido trocado (missense mutations), a prevalência de inibidores é de 5%. Essas mutações são causadas por polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) e são as mais comuns nessas formas de hemofilia.<sup>31</sup>

Estudos têm demonstrado a presença de epítomos imunodominantes nos domínios A2, A3, C2 e na região ácida entre os domínios A1 e A2 do FVIII. Mutações em regiões do gene F8 que decodificam esses domínios da proteína FVIII, principalmente em C2 que apresenta dois epítomos imunodominantes, podem aumentar o risco para a produção de inibidores. Mutações de ponto nos domínios A2 e C2 aumentam o risco de formação de inibidores em cerca de 4 vezes, comparado a pacientes com mutações fora desses domínios. Algumas dessas mutações, como Arg593Cys do domínio A2, Ala2218Thr e Trp2229Cys do domínio C2 e Tyr1786Ser do domínio A3 foram relatadas como possíveis fatores de risco de desenvolvimento de

anticorpos inibidores.<sup>32,33</sup> Outros estudos têm relatado associação entre a mutação Tyr2105Cys no exon 22 do domínio C1 e Arg2150His do exon 23 também no domínio C1, com a produção de anticorpos.<sup>33,34</sup>

### Influência de polimorfismos em genes da resposta imune

O Complexo Maior de Histocompatibilidade Humano (HLA) exerce um importante papel na apresentação de antígenos, e conseqüentemente na formação de anticorpos.<sup>34</sup> Diversos estudos têm procurado correlacionar polimorfismos no HLA com a ocorrência de inibidores. Entretanto, essas associações não têm apresentado significância estatística.

Polimorfismos no gene para o fator de necrose tumoral alfa (TNF), comumente associados a diversas doenças auto-imunes mediadas por anticorpos, também têm sido estudados em relação à produção de inibidores. Entre eles, o alelo -308A do SNP na região promotora TNF. Indivíduos com genótipo -308A/A são propensos ao desenvolvimento de inibidores.<sup>35</sup>

IL-1 é uma citocina pró-inflamatória multifuncional. Associações entre a produção elevada de anticorpos e doenças autoimunes têm sido descritas para polimorfismos no gene IL-1. IL-4 é essencial para a formação de células Th2 e para a produção de IgE. Polimorfismos no gene IL4 estão relacionados a distúrbios alérgicos e auto-imunes. Outra importante citocina atuante na resposta inflamatória e na produção de anticorpos é a IL-10. Um polimorfismo do tipo microssatélite perto da região promotora IL10 está relacionado a uma maior concentração de auto-anticorpos na miastenia gravis, granulomatose de Wegener e no lúpus eritematoso sistêmico e com a concentração de imunoglobulinas em vários tipos de mielomas.<sup>36</sup> Dentre os polimorfismos nestes genes, o que tem sido associado com maior significância ao desenvolvimento de anticorpos inibidores na hemofilia A grave é o alelo (CA)<sup>19</sup> na região promotora do gene IL10.<sup>36</sup>

Outra proteína importante na resposta imune é a CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte associated protein-4), que regula a ativação de células T através de sua ligação a moléculas da família B7, que são expressas em células apresentadoras de antígenos.<sup>37</sup> Polimorfismos no gene CTLA-4 têm sido associados à modulação da resposta imune, influenciando a produção de anticorpos em doenças auto-imunes. O alelo -318C na região promotora do gene da CTLA-4 tem sido referido como fator de proteção ao desenvolvimento de inibidores do FVIII.<sup>37,38</sup>

### Diversidade genética das populações e o desenvolvimento de inibidores

A prevalência de inibidores do FVIII é duas vezes maior em pacientes negros de descendência africana do que em brancos.<sup>39</sup> O mecanismo responsável por esse fato ainda é desconhecido. Em estudo realizado com 137 indivíduos saudáveis e pertencentes a 7 grupos de origens geográficas distintas foram identificados 4 SNPs, cujos haplótipos (combinações alélicas) decodificam 6 proteínas de FVIII distintas, designadas de H1 a H6.<sup>40</sup> Tais haplótipos ocorrem com frequências variadas nos diferentes grupos. Em indivíduos brancos foram encontrados apenas os haplótipos H1 e H2. Em negros, não foi observado o haplótipo H6. O haplótipo H6 foi encontrado apenas em chineses.

também se verificou que dois produtos de FVIII recombinante, muito utilizados no tratamento de episódios hemorrágicos, correspondem aos haplótipos H1 e H2.<sup>40</sup> Em estudo realizado recentemente no Brasil não houve correlação entre a presença de haplótipos H1-H6 e a produção de inibidores em negros,<sup>41</sup> possivelmente refletindo diferenças na origem africana dos negros do Brasil e da América do Norte.

A existência de diferentes haplótipos FVIII implica que produtos derivados de plasma podem conter diferentes haplótipos. Assim, durante a terapia de reposição, há a possibilidade de um indivíduo receber uma proteína exógena cujo haplótipo é divergente de seu próprio fator. Nesta situação hipotética, haplótipos FVIII distintos podem ser reconhecidos como moléculas estranhas ao organismo (antígenos), induzindo a produção de anticorpos inibidores.<sup>40</sup> Mas ainda são necessários mais estudos, pois tal cenário seria válido apenas para hemofílicos com presença de FVIII endógeno. Contudo a divergência entre haplótipos não deve ser um fator causal preponderante visto que aproximadamente 70% dos pacientes sob terapia de reposição não desenvolvem inibidores. Dessa forma, é preciso levar em consideração os demais aspectos que envolvem a terapia.<sup>40</sup>

#### Fatores relacionados ao tratamento

Há controvérsias sobre se o tipo de FVIII administrado aumenta a propensão ao desenvolvimento de inibidores. O foco da discussão é o FvW, que é responsável por manter a estabilidade do FVIII na circulação. FvW está presente nos derivados de plasma, mas ausente no FVIII recombinante, o que poderia deixá-lo exposto à degradação e inativação por anticorpos inibidores.<sup>31</sup> Outro aspecto é a inativação viral do FVIII usado no tratamento, pois o número de relatos de desenvolvimento de inibidores parece ter aumentado após o advento dessas técnicas.<sup>4</sup> Estudos que comparam o FVIII recombinante e o derivado de plasma não têm apresentado diferenças estatísticas significativas, quanto ao desenvolvimento de inibidores, apesar de ser notória a maior ocorrência em pacientes que utilizam o FVIII recombinante.<sup>4</sup>

Resultados inconclusivos também são encontrados quanto ao modo de administração dos produtos. Apesar de a infusão contínua diminuir a quantidade de FVIII necessária durante a terapia, questiona-se se esta forma pode ou não favorecer o desenvolvimento de inibidores.<sup>4</sup>

#### Tratamento das crises hemorrágicas em presença de anticorpos inibidores.

O tratamento de hemorragias nos pacientes com inibidores envolve o uso de altas doses de FVIII ou de agentes que ativam a coagulação de forma independente do FVIII, como o concentrado de complexo protrombínico inativo (CCP) ou ativado (CCPA) e o fator VII ativado recombinante (FVIIa-r).<sup>18</sup>

O uso de derivados de CCP ou CCPA estimula a formação de coágulos cessando os processos hemorrágicos; porém, em alguns casos pode causar excesso de coagulação, e como contém em sua composição alguma quantidade de FVIII e de FIX, pode estimular a produção de anticorpos contra o FVIII.

A administração de FVIIa-r apresenta baixo tempo de ação requerendo assim várias doses a cada 2 - 4 horas. Esses produtos são mais caros e de limitada disponibilidade.

Nos pacientes com baixos títulos de inibidores também podem ser administrados concentrados de FVIII em altas doses. Em hemofilia A leve com inibidores pode ser empregada a desmopressina, que é uma substância análoga ao hormônio antiurético, que promove a liberação de FVIII e de FvW de seus sítios de armazenamento intracelulares.<sup>3,18</sup>

#### Perspectivas de tratamento e novos estudos

Pesquisas atuais têm explorado variáveis genéticas da resposta imune e da via de coagulação sanguínea para compreender melhor o processo de formação de inibidores. Esses estudos auxiliam a evolução de dois caminhos. Em um, a busca de marcadores genéticos que poderiam identificar indivíduos susceptíveis à formação de inibidores, possibilitando uma alteração prévia no tratamento para minimizar ou eliminar o risco de desenvolvimento dos mesmos, e no outro, o desenvolvimento de novos produtos resistentes aos inibidores, de forma a tornar a terapia mais efetiva.

Apesar de existirem medidas terapêuticas que aumentem a eficácia durante a reposição do fator VIII em presença de inibidores, ainda não é possível a neutralização específica dos anticorpos inibidores. Duas alternativas promissoras incluem (a) tornar o sistema imunológico do paciente tolerante ao FVIII exógeno, por intermédio de infusões contínuas do mesmo<sup>3</sup> e (b) o tratamento com peptídeos sintéticos que mimetizam os epítomos reconhecidos pelos inibidores do FVIII, substratos competitivos do FVIII.<sup>16</sup>

#### REFERÊNCIAS

1. Lee CA, Berntorp EE, and Hoots K, Textbook of Hemophilia. Second ed. 2010, Singapore: Wiley-Blackwell. 482p.
2. Brasil, Manual de tratamento das coagulopatias hereditárias. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 2006. Ministério da Saúde: Editora do MS. Brasília, DF. 76p. Data de acesso: 4 de Julho de 2011. Disponível online: [http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/06\\_1132\\_M.pdf](http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/06_1132_M.pdf).
3. Carcao M and Lambert T. Prophylaxis in haemophilia with inhibitors: update from international experience. Haemophilia 2010; 16 Suppl 2: 16-23.
4. Astermark J. Why do inhibitors develop? Principles of and factors influencing the risk for inhibitor development in haemophilia. Haemophilia 2006; 12 Suppl 3: 52-60.
5. Franco RF, de Jonge E, Dekkers PE, Timmerman JJ, Spek CA, van Deventer SJ, et al. The in vivo kinetics of tissue factor messenger RNA expression during human endotoxemia: relationship with activation of coagulation. Blood 2000; 96: 554-9.
6. Franco RF. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. In Simpósio: Hemostasia e Trombose, Capítulo I. 2001. Ribeirão Preto: Medicina, Ribeirão Preto.

7. Dahlback B. Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *J Intern Med* 2005; 257: 209-23.
8. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 1984; 312: 326-30.
9. Graw J, Brackmann HH, Oldenburg J, Schneppenheim R, Spannagl M, and Schwaab R. Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nat Rev Genet* 2005; 6: 488-501.
10. Vehar GA. Bioengineering of blood plasma proteins. *Scand J Haematol Suppl* 1984; 40: 45-51.
11. Lenting PJ, van Mourik JA, and Mertens K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood* 1998; 92: 3983-96.
12. Fang H, Wang L, and Wang H. The protein structure and effect of factor VIII. *Thromb Res* 2007; 119: 1-13.
13. Van den Brink EN, Turenhout EA, Bank CM, Fijnvandraat K, Peters M, and Voorberg J. Molecular analysis of human anti-factor VIII antibodies by V gene phage display identifies a new epitope in the acidic region following the A2 domain. *Blood* 2000; 96: 540-5.
14. Lacroix-Desmazes S, Navarrete AM, Andre S, Bayry J, Kaveri SV, and Dasgupta S. Dynamics of factor VIII interactions determine its immunologic fate in hemophilia A. *Blood* 2008; 112: 240-9.
15. Shen BW, Spiegel PC, Chang CH, Huh JW, Lee JS, Kim J, et al. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. *Blood* 2008; 111: 1240-7.
16. Chaves DG. Avaliações imunogenéticas do desenvolvimento de anticorpos inibidores do Fator VIII na hemofilia A. Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2010, 118p. Disponível em: [http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/BUBD-8A5PSB/1/tese\\_daniel\\_chaves.pdf](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/BUBD-8A5PSB/1/tese_daniel_chaves.pdf)
17. Schwaab R, Brackmann HH, Meyer C, Seehafer J, Kirchgesser M, Haack A, et al. Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1402-6.
18. Brasil, Hemofilia congênita e inibidor: manual de diagnóstico e tratamento de eventos hemorrágicos. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 2009. Ministério da Saúde: Editora do MS. Brasília, DF. 56p. Data de acesso: Disponível online: [http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/hemofilia\\_congenita\\_inibidor\\_diagnostico\\_tratamento.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/hemofilia_congenita_inibidor_diagnostico_tratamento.pdf).
19. Key NS. Inhibitors in congenital coagulation disorders. *Br J Haematol* 2004; 127: 379-91.
20. Verbruggen B, Giles A, Samis J, Verbeek K, Mensink E, and Novakova I. The type of factor VIII deficient plasma used influences the performance of the Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII inhibitors. *Thromb Haemost* 2001; 86: 1435-9.
21. Ehrenforth S, Kreuz W, Scharrer I, Linde R, Funk M, Gungor T, et al. Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs. *Lancet* 1992; 339: 594-8.
22. Bray GL, Kroner BL, Arkin S, Aledort LW, Hilgartner MW, Eyster ME, et al. Loss of high-responder inhibitors in patients with severe hemophilia A and human immunodeficiency virus type 1 infection: a report from the Multi-Center Hemophilia Cohort Study. *Am J Hematol* 1993; 42: 375-9.
23. Scharrer I, Bray GL, and Neutzling O. Incidence of inhibitors in haemophilia A patients--a review of recent studies of recombinant and plasma-derived factor VIII concentrates. *Haemophilia* 1999; 5: 145-54.
24. Rodriguez-Merchan EC and Lee CA. Inhibitors in patients with haemophilia. 2002, Osney Mead, Oxford: Blackwell Science. 217p.
25. Chaves DG and Rodrigues CV. Desenvolvimento de inibidores do fator VIII na hemofilia A. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* [online] 2009; 31: 384-390.
26. Lollar P. Pathogenic antibodies to coagulation factors. Part one: factor VIII and factor IX. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1082-95.
27. Zhong D, Saenko EL, Shima M, Felch M, and Scandella D. Some human inhibitor antibodies interfere with factor VIII binding to factor IX. *Blood* 1998; 92: 136-42.
28. Arai M, Scandella D, and Hoyer LW. Molecular basis of factor VIII inhibition by human antibodies. Antibodies that bind to the factor VIII light chain prevent the interaction of factor VIII with phospholipid. *J Clin Invest* 1989; 83: 1978-84.
29. Wootla B, Mahendra A, Dimitrov JD, Friboulet A, Borel-Derlon A, Rao DN, et al. Factor VIII-hydrolyzing IgG in acquired and congenital hemophilia. *FEBS Lett* 2009; 583: 2565-72.
30. Ghosh K and Shetty S. Immune response to FVIII in hemophilia A: an overview of risk factors. *Clin Rev Allergy Immunol* 2009; 37: 58-66.
31. Zhang AH, Skupsky J, and Scott DW. Factor VIII inhibitors: risk factors and methods for prevention and immune modulation. *Clin Rev Allergy Immunol* 2009; 37: 114-24.
32. Hay CR. Factor VIII inhibitors in mild and moderate-severity haemophilia A. *Haemophilia* 1998; 4: 558-63.
33. Repesse Y, Slaoui M, Ferrandiz D, Gautier P, Costa C, Costa JM, et al. Factor VIII (FVIII) gene mutations in 120 patients with hemophilia A: detection of 26 novel mutations and correlation with FVIII inhibitor development. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1469-76.
34. Franchini M, Girelli D, Olivieri O, Castaman G, Lippi G, Poli G, et al. Tyr2105Cys mutation in exon 22 of FVIII gene is a risk factor for the development of inhibitors in patients with mild/moderate haemophilia A. *Haemophilia* 2006; 12: 448-51.
35. Astermark J, Oldenburg J, Carlson J, Pavlova A, Kavakli K, Berntorp E, et al. Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 2006; 108: 3739-45.
36. Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, and Lefvert AK. Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 2006; 107: 3167-72.
37. Pavlova A, Diaz-Lacava A, Zeitler H, Satoguina J, Niemann B, Krause M, et al. Increased frequency of the CTLA-4 49 A/G polymorphism in patients with acquired haemophilia A compared to healthy controls. *Haemophilia* 2008; 14: 355-60.
38. Bafunno V, Santacroce R, Chetta M, D'Andrea G, Pisanelli D, Sessa F, et al. Polymorphisms in genes involved in autoimmune disease and the risk of FVIII inhibitor development in Italian patients with haemophilia A. *Haemophilia* 2010; 16: 469-73.
39. Viel KR, Machiah DK, Warren DM, Khachidze M, Buil A, Fernstrom K, et al. A sequence variation scan of the coagulation factor VIII (FVIII) structural gene and associations with plasma FVIII activity levels. *Blood* 2007; 109: 3713-24.
40. Viel KR, Ameri A, Abshire TC, Iyer RV, Watts RG, Lutchter C, et al. Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia. *N Engl J Med* 2009; 360: 1618-27.
41. Santos A. Caracterização de aspectos genéticos e imunológicos envolvidos no desenvolvimento de inibidores em hemofilia A e B. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2010, 189p. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000480765>
42. Humphrey W, Dalke A, and Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 1996; 14: 33-8, 27-8.