

**ASPECTOS EPIGENÉTICOS DO DESENVOLVIMENTO DE  
ANTICORPOS INIBIDORES DO FATOR FVIII EXÓGENO NO  
TRATAMENTO DE PORTADORES DE HEMOFILIA A**

**THIAGO BARBOSA DE SOUZA**

Tese de Doutorado

**Orientador: Enrique Medina-Acosta**

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
DEZEMBRO DE 2018

**ASPECTOS FARMACOGENÉTICOS E EPIGENÉTICOS DO  
DESENVOLVIMENTO DE ANTICORPOS INIBIDORES DO FATOR FVIII  
EM PORTADORES DE HEMOFILIA A**

**THIAGO BARBOSA DE SOUZA**

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia

**Orientador: Enrique Medina-Acosta**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
DEZEMBRO DE 2018**

**O círculo**

Dúvida?  
Para onde vamos?  
Qual o sentido da vida?  
Qual a cor?  
Questiona!  
Evolui e encontra respostas  
Mas com as respostas  
Mais dúvidas  
Infindáveis  
Uma sobre a outra  
E assim você continua  
Caminhando no eterno círculo da dúvida  
Dúvida?  
Mas a que ponto chegastes?  
No ponto de partida!

## Sumário

Lista de figuras .....	6
Lista de abreviaturas .....	7
Agradecimentos .....	9
Resumo .....	10
Abstract .....	11
1. Introdução.....	12
1.1. Alterações Epigenéticas na Saúde e na Doença .....	14
1.2. Metilação do DNA e Regulação da Resposta Imune .....	16
1.3. A Hemofilia A .....	19
1.4. Desenvolvimento de Anticorpos Inibidores .....	21
1.5. Aspectos Imunológicos do Desenvolvimento de Inibidores.....	23
1.6. Fatores de Risco para o Desenvolvimento de Inibidores .....	24
1.7. Diagnóstico de inibidores .....	27
1.8. Abordagem terapêutica na hemofilia com inibidor .....	29
1.9. Novas perspectivas no tratamento.....	30
2. Hipótese de Trabalho.....	31
3. Justificativa .....	31
4. Objetivo Principal.....	32
4.1. Objetivos Específicos .....	32
5. Materiais e Métodos.....	33
5.1. Genes Alvo e Estratégia de Análise .....	33
5.2. Tipo de Estudo .....	35
5.3. Aspectos Éticos.....	39
5.4. Extração de DNA .....	39
5.5. Caracterização dos Alelos Amplificados .....	39

5.6. Determinação dos Perfis Pontuais de Metilação .....	40
5.7. Análise Estatística e figuras .....	41
6. Resultados e Discussão .....	42
7. Conclusão.....	59
8. Referências Bibliográficas .....	60

## Lista de figuras

Figura 1. Resposta imune inicial ao FVIII.....	22
Figura 2: Prevalência de inibidor em 2015 .....	29
Figura 3: Padronização do ensaio DESM-QFPCR.....	35
Figura 4: Eletroferograma representativo do ensaio DESM-QFPCR. ....	43
Figura 5: Dados do UCSC Genome Browser quanto à região de 258 pb avaliada no gene IL4. ....	44
Figura 6: Porcentagens de metilação para um sítio CpG no gene IL4 em 10 amostras de homens saudáveis não relacionados.....	46
Figura 7: Porcentagens de metilação para um segundo sítio CpG no gene IL4 em 10 amostras de homens não relacionados.....	47
Figura 8: Porcentagens de metilação para um terceiro sítio CpG no gene IL4 em 10 amostras de homens não relacionados.....	47
Figura 9: Porcentagens de metilação para um sítio CpG no gene TNF em 10 amostras de homens não relacionados.....	48
Figura 10: Análise do perfil de metilação para os genes IFNG (A), IL2 (B), IL1B (C) e IL10 (D) entre os grupos Inh+, Inh- e NH. ....	49
Figura 11: Análise do perfil de metilação para CTLA4 alvo1 (A), CD28 (B), CTLA4 alvo 2 (C) e TNF (D) entre os grupos Inh+, Inh- e NH.....	50
Figura 12: Distribuição das porcentagens de metilação entre os grupos para um segundo alvo em IL4. ....	56
Figura 13: Análise do perfil de metilação para os genes IL4 alvo 1 (A), IL4 alvo 3 (B), IL6 (C) e CST7 (D) entre os grupos Inh+, Inh- e NH. ....	57
Figura 14: Valores absolutos de metilação dos grupos expandidos.....	58

## Lista de abreviaturas

5caC - 5-caboximetilcitosina  
5fC - 5-formilcitosina  
5-hmC - 5-hidroximetilcitosina  
5mC - Sítio CpG metilado (5-metil-citosina)  
aa - Aminoácidos  
Alu - Sequência de transposição  
Arg - Arginina  
C - Citosina  
Ca<sup>2+</sup> - Íons cálcio +2  
CD28 - Cluster de diferenciação 28 (gene)  
CpG - Sítio de metilação em uma citosina seguida de guanina na mesma fita de DNA  
CST7 - Cistatina F (gene)  
CTLA4 - Linfócito T citotóxico associado à proteína 4 (gene)  
Cys - Cisteína  
DESM-QFPCR – Digestão enzimática sensível à metilação, seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa e fluorescente  
DNA - Ácido desoxirribonucléico  
DNMT1 - Metiltransferase do tipo 1  
DNMT3A - Metiltransferase do tipo 3A  
DNMT3B - Metiltransferase do tipo 3B  
DNMTs - Enzimas DNA metiltransferase  
F8 - Gene do fator VIII de coagulação (gene)  
FIXa - Fator IX de coagulação ativo  
FVIII - Fator VIII de coagulação  
FVIII:Ag - Nível residual do fator VIII presente no plasma  
FVIII:C - Atividade funcional do Fator VIII  
FVIIIa - Fator VIII de coagulação ativo  
FvW - Fator Von Willebrand  
G - Guanina  
HA – Hemofilia A  
His - Histidina  
HIV - Vírus da imunodeficiência humana  
HLA - Complexo maior de histocompatibilidade  
IFNG - interferon gama (gene)  
IFN- $\gamma$  - Interferon gama (proteína)  
IgG - Imunoglobulina G  
IgG4 - Imunoglobulina G subtipo 4  
IL10 - Interleucina 10 (gene)  
IL-10 - Interleucina 10 (proteína)  
IL13 - Interleucina 13  
IL17 - Interleucina 17  
IL1B - Interleucina 1 beta (gene)  
IL2 - Interleucina 2 (gene)  
IL-2 - Interleucina 2 (proteína)  
IL4 - Interleucina 4 (gene)  
IL-4 - Interleucina 4 (proteína)  
IL6 - Interleucina 6 (gene)  
Inh (+) – Paciente hemofílico positivo para produção de inibidores

Inh (-) – Paciente hemofílico negativo para produção de inibidores  
Kb - Kilobases  
LINE - Sequência de transposição  
NH - Não hemofílicos  
pb - pares de base  
RNA - Ácido ribonucléico  
RNAi - RNA de interferência  
TCD4+ - Linfócito T auxiliar  
TCD8+ - Linfócito T citotóxico  
TCR – Receptor de célula T  
TET - Ten-eleven translocation  
TGF- $\beta$ 1 - Fator de transformação do crescimento beta 1  
Th1 - Células T helper tipo 1  
Th17 - Células T helper tipo 17  
Th2 - Células T helper tipo 2  
TNFa - Fator de necrose tumoral alfa (gene)  
Tyr - Tirosina  
Xq28 – Cromossomo X, braço longo, posição 28



## **Agradecimentos**

Agradeço ao professor Enrique pelos ensinamentos prestados ao longo desses anos desde a iniciação científica. Por todo o incentivo e orientação que me permitiram evoluir academicamente e profissionalmente.

Agradeço à minha mãe, Maria Célia, por todo seu apoio incondicional ao longo de minha vida, sempre incentivando os estudos e aperfeiçoamento individual. Aos meus irmãos Verônica e Leandro pela parceria e apoio ao longo de minha caminhada. Ao meu pai Dirceu, por sempre instigar a curiosidade e espírito científico desde minha infância. Aos demais familiares, por todo apoio e torcida para que chegasse até aqui. Agradeço à minha namorada Renata e sua família, por sempre apoiarem minha jornada nesses últimos 4 anos.

Agradeço aos professores Fabrício e Adriana de minha graduação, responsáveis por estimular a carreira acadêmica. Aos professores Arnoldo e Leonardo da UENF, também presentes em minha formação durante o mestrado. Agradeço aos amigos e companheiros do NUDIM Cristina, Alan, Pedro, Douglas, Filipe, Jozimara, Antônio, Fabrício, Viviane, Cíntia, Maria e Diego, por todo apoio e companheirismo ao longo desses anos. Agradecimento especial à Cleiton, pela colaboração e amizade durante o doutorado. Agradecimento especial à Thais pela colaboração, ensinamentos e apoio desde a iniciação científica.

Agradeço aos colaboradores argentinos, sem os quais não seria realizado o presente projeto, Liliane e Carlos. Agradeço às agências de fomento, FAPERJ, CAPES e CNPq, por possibilitarem fomento dos experimentos e demais gastos.

## Resumo

Epigenética é o estudo de alterações hereditárias no padrão de expressão gênica sem modificação na sequência de DNA. A metilação do DNA é a marca epigenética mais bem caracterizada. Estudos de caso-controle têm encontrado padrões únicos de metilação em indivíduos acometidos por determinadas doenças quando comparados a indivíduos saudáveis. Assim, o estado de sítios CpG tem sido associado às doenças como câncer, desordens do sistema imune, desordens neurológicas, entre outras. Não existe literatura relacionando metilação de DNA e hemofilia A. Esta doença é a desordem de coagulação mais frequente no mundo. Acomete um a cada cinco mil meninos nascidos vivos. É caracterizada por sangramentos intensos durante processo cirúrgico ou traumas. A causa da hemofilia A está relacionada à deficiência de fator VIII circulante, importante componente da cascata de coagulação. É ocasionada por mutações no gene *F8*, responsável pela transcrição do fator VIII de coagulação. A terapia padrão consiste em repor o fator deficiente por infusão intravenosa. Atualmente, o principal evento adverso da terapia consiste na produção de anticorpos inibidores do FVIII, que se ligam ao fator exógeno impedindo seu efeito coagulante resultando em encarecimento da terapia e mortes. Diversos fatores de risco têm sido descritos para o desenvolvimento de inibidores, entre eles idade, tipo de fator administrado, etnicidade, entre outros. Ainda não foram descritos riscos epigenéticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o estado de metilação de sítios CpG em regiões regulatórias de genes da resposta imune em hemofílicos com e sem inibidores e em indivíduos normais. Foram avaliados os genes *IL1B*, *IL2*, *IL4*, *IL6*, *IL10*, *TNFa*, *IFNG*, *CTLA4*, *CD28* e *CST7*. Não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os grupos (hemofílicos com e sem inibidores e indivíduos normais) avaliados no contexto dos sítios CpG analisados. A metodologia empregada também possibilitou avaliar a distribuição de uma deleção no gene *IL6* (rs397766885) nos grupos investigados, não apresentando diferença na distribuição da deleção. Embora não tenha sido encontradas alterações epigenéticas com significância estatística entre os grupos, foram gerados dados epigenéticos em portadores de hemofilia A.

**Palavras chaves:** Epigenética, Fator VIII, Hemofilia A, Inibidores, Metilação

**Abstract**

Epigenetics is the study of hereditary changes in the pattern of gene expression without modification in the DNA sequence. DNA methylation is the most well characterized epigenetic mark. Case-control studies have found unique patterns of methylation in individuals afflicted with certain diseases when compared to healthy individuals. Thus, the status of CpG sites has been associated with diseases such as cancer, disorders of the immune system, neurological disorders, among others. There is no literature relating DNA methylation and haemophilia A. This disease is the most common clotting disorder in the world. It affects one in five thousand live-born children. It is characterized by severe bleeding during surgical procedure or trauma. The cause of hemophilia A is related to the deficiency of circulating factor VIII, an important component of the coagulation cascade. Haemophilia is caused by mutations in the F8 gene, which is responsible for the coagulation factor VIII transcription. Standard therapy is to replace the deficient factor by intravenous infusion. Currently, the main adverse event of the therapy is the production of antibodies inhibiting FVIII, which bind to the exogenous factor, preventing its coagulant effect, resulting in increased therapy and deaths. Several risk factors have been described for the development of inhibitors, among them age, type of factor administered, ethnicity, among others. Epigenetic risks have not been described. The aim of this work was to evaluate the methylation status of CpG sites in regulatory regions of immune response genes in hemophiliacs with and without inhibitors and in normal individuals. *IL1B*, *IL2*, *IL4*, *IL6*, *IL10*, *TNF*, *IFNG*, *CTLA4*, *CD28* and *CST7* genes were evaluated. No significant statistical differences were found between the groups (hemophiliacs with and without inhibitors and normal individuals) evaluated in the context of the analyzed CpG sites. The methodology employed also allowed to evaluate the distribution of a deletion in the IL6 gene (rs397766885) in the investigated groups, showing no difference in the deletion distribution. Although no epigenetic changes were found with statistical significance between the groups, epigenetic data were generated in patients with hemophilia A.

**Keywords:** Epigenetics, Factor VIII, Hemophilia A, Inhibitors, Methylation

## 1. Introdução

“É preciso correr o máximo possível para permanecermos no mesmo lugar.” Esta frase, do livro *Alice através do espelho*, de Lewis Carroll em 1871, é uma alegoria da evolução que enuncia a hipótese de que cada espécie existente está inserida em um sistema biológico que coevolui. Dessa forma, é necessário um desenvolvimento contínuo de cada espécie para poder competir com outras e sobreviver neste sistema em transformação contínua. Neste cenário, variação é sinônimo de adaptação e sobrevivência (VAN VALEN, 1973). Esta hipótese facilita a compreensão da alta variabilidade genética existente entre indivíduos de espécies diferentes ou até dentro da mesma espécie. Entretanto, não explica por que em um indivíduo, células com mesmo código genético são tão diferentes. Como exemplo, uma célula da pele comparada a uma célula da retina. Em um mesmo indivíduo, tais células, com fenótipos tão divergentes, apresentam o mesmo código genético. O que explica essa diferença são os padrões de expressão gênica, estes sendo únicos para cada tipo celular (LUKK *et al.*, 2010; BASSE *et al.*, 2015).

A geometria da cromatina é quem dita se um gene será expresso ou não. Estado de eucromatina, em que a cromatina se encontra em conformação aberta, facilita a expressão. Estado de heterocromatina, em que a cromatina se encontra em conformação mais fechada, inibe a expressão. Entre os mecanismos envolvidos na formação da eucromatina ou heterocromatina estão variações epigenéticas (TAMARU, 2010). Variação epigenética, é toda aquela que modifica a expressão gênica sem modificar a sequência de DNA. Envolvem modificações de histonas, microRNAs, metilação do DNA entre outras (TAMARU, 2010). Uma das marcas epigenéticas mais bem descritas é a metilação do DNA, que consiste na adição de um grupo metil em uma citosina seguida de guanina na mesma fita (contexto CpG, Citosina-fosfato-Guanina) formando a variante de citosina 5mC (5-metil-citosina) (KRIAUCIONIS e HEINTZ, 2009).

Os sítios CpG estão distribuídos ao longo do genoma, apresentando-se de forma metilada (5mC) ou desmetilada. A maior parte encontra-se no estado metilado (5mC) e está situada em regiões intragênicas e em sequências repetidas (principalmente pericentroméricas) contribuindo respectivamente para

a expressão e estabilidade cromossômica (GARCIA-GIMENEZ *et al.*, 2012). No estado desmetilado, os sítios CpG estão agrupados em regiões denominadas Ilhas CpG, situadas principalmente em promotores gênicos de expressão constitutiva. Diversos estudos têm demonstrado que existe relação entre o estado de metilação de determinados genes com certos fenômenos patológicos. Entre eles o câncer, desordens do sistema imune, doenças neurológicas, cardiovasculares, entre outras (HANDY *et al.*, 2011). Há também alterações do padrão de metilação com o processo de envelhecimento em qualquer indivíduo, normal ou doente (HUANG *et al.*, 2015).

Até o momento, nenhum estudo verificou alteração dos padrões de metilação em indivíduos com hemofilia A. Esta é a desordem de coagulação mais frequente no mundo, acometendo um a cada cinco mil nascidos vivos, ocorrendo principalmente em homens (GRAW *et al.*, 2005). É caracterizada por sangramentos intensos durante processo cirúrgico ou traumas. A causa da hemofilia A está relacionada à deficiência de fator VIII circulante, importante componente da cascata de coagulação. Tal deficiência é ocasionada por mutações no gene *F8*, responsável pela transcrição do fator VIII de coagulação. As mutações incluem inversões, deleções ou inserções, mutações de sentido trocado ou sem sentido (MARGAGLIONE, CASTAMAN, MORFINI, ROCINO, SANTAGOSTINO, TAGARIELLO, TAGLIAFERRI, ZANON, BIOCCHI, CASTALDO, PEYVANDI, SANTACROCE, TORRICELLI, GRANDONE, MANNUCCI, *et al.*, 2008). Como terapia padrão, os hemofílicos são tratados com infusão intravenosa do fator deficiente, na forma recombinante ou derivada de plasma (BRASIL, 2006; CARCAO e LAMBERT, 2010). Atualmente, o principal evento adverso da terapia consiste na produção de anticorpos inibidores do FVIII que se ligam ao fator exógeno impedindo seu efeito coagulante, o que resulta em encarecimento da terapia e mortes. Diversos fatores de risco para produção de inibidores têm sido descritos, como o tipo de mutação causadora de hemofilia, tipo de fator administrado, idade do paciente, fatores étnicos entre outros (GHOSH e SHETTY, 2009). Nesses pacientes ainda não foram descritas variações epigenéticas, como por exemplo estados diferenciados de metilação de DNA. Assim, o objetivo deste projeto foi identificar marcadores epigenéticos (sítios CpG) de propensão ao desenvolvimento de inibidores do Fator VIII em pacientes acometidos por

hemofilia A. Foram avaliados os genes *IL1B*, *IL2*, *IL4*, *IL6*, *IL10*, *TNFA*, *IFNG*, *CTLA4*, *CD28* e *CST7*.

### 1.1. Alterações Epigenéticas na Saúde e na Doença

Epigenética é o estudo de alterações hereditárias no padrão de expressão gênica sem modificações na sequência de DNA. Envolve vias e moléculas que regulam o estado conformacional da cromatina, alternando entre estado de eucromatina e heterocromatina, ditando assim a expressão gênica. Entre os mecanismos envolvidos na regulação epigenética estão a metilação do DNA, modificações de histonas, RNAs de interferência (RNAi) e a organização nuclear (JIRTLE e SKINNER, 2007). Tais modificações regulam importantes processos biológicos em um organismo, como a manutenção da estabilidade cromossômica, divisão celular, *imprinting* genômico, inativação do cromossomo X, silenciamento gênico, etc. (RODENHISER e MANN, 2006; GARCIA-GIMENEZ *et al.*, 2012) necessários para o desenvolvimento normal, crescimento e diferenciação celular.

O genoma humano contém cerca de 25000 genes (INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING, 2004), alguns dos quais expressam em todos os tecidos, outros apresentam expressão tecido-específica. Em ambos os casos, um gene irá expressar em um dado momento sob estímulos específicos. Os genes estão distribuídos ao longo do código genético que está organizado em nucleossomas. (Todo o material genético encontra-se enovelado em um octâmero de histonas, o nucleossomo). O conjunto de nucleossomas forma a cromatina. O estado conformacional da cromatina é que ditará a expressão gênica. Os genes, quando inativos, apresentam estado de cromatina condensado (heterocromatina). Quando o gene está ativo, a cromatina apresenta-se aberta (eucromatina) (MARGUERON e REINBERG, 2010). O estado conformacional da cromatina é regulado por mecanismos epigenéticos. Os mecanismos mais bem descritos são as modificações de histonas e a metilação de DNA (MARGUERON e REINBERG, 2010).

As modificações de histonas direcionam a organização do material genético e a expressão. Tais modificações regulam a acessibilidade de regiões gênicas regulatórias para expressão ou silenciamento. Regiões

transcricionalmente ativas apresentam altos níveis de acetilação de histonas, enquanto que regiões inativas são ricas em desacetilação de histonas. A outra modificação epigenética mais bem descrita é a metilação do DNA (MARGUERON e REINBERG, 2010; GARCIA-GIMENEZ *et al.*, 2012). A metilação ocorre em resíduos de citosina no contexto CpG, podendo estar presente em regiões ricas em CpG (ilhas CpG) ou em regiões pobres desses resíduos. Tais ilhas são comuns em regiões promotoras de genes com expressão constitutiva. Promotores desmetilados são alvos para fatores de transcrição ou outras proteínas regulatórias que promovem a transcrição (GARCIA-GIMENEZ *et al.*, 2012). Em contrapartida, regiões promotoras metiladas estão mais associadas à silenciamento gênico por impedir a ligação de fatores de transcrição. O padrão de metilação é regulado por enzimas DNAs metil-transferase (DNMTs).

Alteração global do estado de metilação tem sido associada a diversas doenças (HANDY *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2015). A flutuabilidade das marcas epigenéticas durante o envelhecimento de um organismo é um processo intimamente relacionado ao câncer. Sabe-se que ocorre hipometilação do genoma de um humano com o decorrer dos anos. Paradoxalmente, verifica-se hipermetilação em regiões promotoras de genes com função chave na supressão tumoral. Tal fato ocasiona câncer e já foi descrito para diversos tipos de tumores malignos (RODENHISER e MANN, 2006). Quando o estado normal de uma ou mais marcas epigenéticas foge da flutuabilidade fisiológica aceitável, podem ocorrer anormalidades. Entre esses erros epigenéticos, estão a hipermetilação do DNA que pode resultar em silenciamento de genes supressores tumorais, hipometilação ocasionando ativação de oncogenes, defeitos de *imprinting* e mutações nos sítios metilados, resultando em expressão gênica inapropriada (RODENHISER e MANN, 2006).

Fibroblastos cultivados até a senescência apresentam perda de metilação (WILSON e JONES, 1983). Diversos tecidos apresentam declínio na metilação em sítios CpG (WILSON *et al.*, 1987; GOLBUS *et al.*, 1990). A perda de metilação com o envelhecimento, afeta primeiramente sequências de DNA repetidas nos centrômeros e em elementos parasitas como sequências de transposição Alu e LINE (BESTOR e TYCKO, 1996). Hipometilação também é encontrada em íntrons e sequências codantes de genes específicos

(SLAGBOOM *et al.*, 1990). De maneira geral, cada célula do corpo é única quanto as suas marcas epigenéticas. Essas marcas seguem um padrão tecido-específico, o que possibilita a diferenciação celular. Atualmente as pesquisas convergem para análises de metiloma e mapas de modificações de histonas. Tem encontrado aplicações em câncer, desordens do sistema imune, envelhecimento, desordens neuropsiquiátricas e doenças cardiovasculares (CREA, 2012; WHITAKER *et al.*, 2013; JOHNSON *et al.*, 2014; CORDOVA-PALOMERA *et al.*, 2015; STIRZAKER *et al.*, 2015). Futuramente, esse conjunto de informações possibilitará o emprego de mais uma ferramenta molecular para diferenciar uma célula jovem de uma idosa ou uma célula saudável de uma doente.

## 1.2. Metilação do DNA e Regulação da Resposta Imune

As citosinas de diversos organismos são alvos para modificações covalentes sendo que a mais comum consiste na adição de um grupo metil ao carbono cinco da citosina (5mC). Ocorre em citosinas seguidas de guaninas, no contexto citosina-fosfato-guanina (CpG) (KRIAUCIONIS e HEINTZ, 2009). Esta combinação confere uma sequência palindrômica na qual a sequência molde e sua complementar apresentam-se metilados de forma simétrica em ambas as fitas. Tal fato é importante durante a divisão celular quando ambas as cromátides irmãs estão em estado de hemimetilação (ULAHANNAN e GREALLY, 2015). As novas fitas sintetizadas são então metiladas pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMT). Essas enzimas reconhecem sítios CpG hemimetilados. Tal evento representa o mecanismo molecular mais bem caracterizado de herança não genética (ULAHANNAN e GREALLY, 2015).

DNMT1 promove metilação de sítios hemimetilados durante a replicação celular, enquanto que DNMT3A e DNMT3B promovem metilação *de novo*. Em contrapartida, sítios CpG metilados podem ser oxidados por enzimas da família TET formando 5-hidroximetilcitosina (5hmC), a qual é posteriormente oxidada a 5-formilcitosina (5fC) e depois a 5-caboximetilcitosina (5caC). Acredita-se que estas etapas estão envolvidas na transição de 5mC para citosina não modificada (KRIAUCIONIS e TAHILIANI, 2014). Os sítios CpG estão distribuídos ao longo do genoma. Estão situados em regiões ricas em CpG



(Ilhas CpG), que por definição são sequências com conteúdo de C+G>0.55, densidade observada x esperada >0.5 e comprimento maior que 300pb (AERTS *et al.*, 2004). Podem também estar situados fora de ilhas em regiões pobres de CpG. Regiões repetitivas pericentroméricas são ricas em 5mC pela ação da DNMT3B.

A metilação de DNA em promotores reprime a transcrição de forma direta ou indireta. Na forma direta, a adição de um grupo metil antagoniza a ligação de um fator de transcrição em seu motif. Na maneira indireta, a adição da metila recruta proteínas de ligação a sítios CpG metilados, recrutamento de histona desacetilases e histona metiltransferases, e outros fatores envolvidos na heterocromatização deixando a região menos acessível a fatores de transcrição (FITZPATRICK e WILSON, 2003). Em contraste, sítios CpG desmetilados promovem estado de eucromatina, por deixar a região mais acessível à ligação de fatores de transcrição. A importância de mecanismos epigenéticos já está bem descrita em câncer (BUTCHER e RODENHISER, 2007). No campo da imunologia, a compreensão dos mecanismos envolvidos tem crescido na última década.

No contexto da resposta imune, sabe-se que a metilação é um processo importante para a manutenção da estabilidade de linhagens de células T. Também já é conhecido que ocorre desmetilação massiva durante a ativação de células T, e este evento é específico e seletivo para os diferentes subtipos de células. Durante a diferenciação para células Th1 ocorre desmetilação do *locus IFNG*. Tal fato não é observado em subtipos Th2 e Th17. Sabe-se também que regiões regulatórias dos genes *IL4*, *IL13* e *IL17a* encontram-se metilados em células T virgem e desmetiladas durante a diferenciação celular para Th2 e Th17 (SCHOENBORN *et al.*, 2007; SANTANGELO *et al.*, 2009; AUNE *et al.*, 2013).

Alterações globais do estado de metilação contribuem ativamente em doenças autoimunes. Sabe-se que drogas que afetam a metilação do DNA, como a 5-Azacitidina pode induzir auto reatividade de células T produzindo uma doença *lúpus-like* em camundongos (QUDDUS *et al.*, 1993). Com relação às citocinas, a metilação promove regulação de sua produção em diversos níveis, incluindo ativação, expressão monoalélica e regulação de ciclo celular (FITZPATRICK e WILSON, 2003). A IL2 foi uma das primeiras citocinas em

que foi verificada uma expressão alterada por metilação. Em células T virgem, esse gene não está expresso, seu promotor está metilado e a cromatina nessa região encontra-se condensada (WARD *et al.*, 1998; BRUNIQUEL e SCHWARTZ, 2003). A desmetilação da região promotora desse gene se inicia dentro de 4 horas após estímulo *in vitro* e dentro de 20 minutos após estímulo *in vivo*. O processo de metilação no promotor gênico regula a expressão de *IL2* (BRUNIQUEL e SCHWARTZ, 2003).

Outro exemplo é o gene *IFNG*, que transcreve o Interferon Gama ( $IFN-\gamma$ ), importante citocina pró-inflamatória e regulador de resposta Th1. Há evidências em camundongos e humanos de que a metilação desse gene regula sua expressão. Sob estímulo imunológico, o promotor desse gene sofre perda de metilação e herança após expansão clonal (FITZPATRICK *et al.*, 1999). Sabe-se também que esse processo pode ser revertido em células infectadas com HIV, ocorrendo metilação de novo e consequente repressão da expressão do *IFNG* (MIKOVITS *et al.*, 1998). Outro exemplo é o gene *IL4*, que transcreve a citocina IL-4, importante mediador anti-inflamatório de resposta Th2. É comprovado que a ativação de linfócitos TCD4+ leva à desmetilação de resíduos CpG, descondensação da cromatina, expressão monoalélica de *IL4* e expansão clonal (RIVIERE *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 2002; SANTANGELO *et al.*, 2002).

Diversos estudos têm interpretado os níveis de metilação em sangue total como uma evidência biológica com relação determinística entre estado desmetilado ou metilado de alguma região gênica específica à alguma patogênese. Entretanto, um estudo recente demonstrou que os níveis de metilação em sangue total são diferentes dos níveis encontrados para populações de células purificadas. Em sangue total não é considerada a contribuição de subpopulações menos frequentes. Como exemplo, eosinófilos, que são tipos celulares menos abundantes, seus níveis de metilação podem ser mascarados por outros granulócitos, como os neutrófilos, que são subtipos mais abundantes. Esse estudo concluiu que se for utilizado sangue total, é necessário ajustar os níveis de metilação à quantidade de subpopulações (REINIUS *et al.*, 2012).

### 1.3. A Hemofilia A

A hemofilia A é a desordem de coagulação sanguínea mais severa e frequente no mundo (GRAW *et al.*, 2005). Pode afetar um para cada 5000 meninos nascidos vivos. As primeiras referências sobre coagulopatias semelhante à hemofilia surgiram por volta do século III DC, nos escritos judaicos (Talmude) em que há descrição do que um patriarca dispensa crianças da circuncisão pelo fato de haver relatos familiares de óbitos de meninos após passar por esse procedimento. A primeira descrição médica da hemofilia na América foi feita por Dr. John Otto, onde também criou os conceitos de mulher portadora, herança ligada ao sexo e morte prematura na patologia da hemofilia (LEE *et al.*, 2010). A hemofilia A também foi chamada de doença real pelo fato de a rainha Vitória da Inglaterra (1837-1901) ser uma portadora e espalhar o gene mutante para famílias reais da Espanha, Alemanha e Rússia (LEE *et al.*, 2010).

Ao longo dos séculos, diversos sintomas clínicos têm sido descritos para a hemofilia, mas a verdadeira compreensão acerca da etiologia da doença e os mecanismos moleculares envolvidos na patogênese só foram alcançados com o advento das técnicas de biologia molecular no século XX. O primeiro sequenciamento da região codante do fator VIII de coagulação foi feito em 1984 (GITSCHIER *et al.*, 1984). Desde então se tornou possível identificar a mutação causadora da hemofilia e rastrear a origem do alelo mutante. Atualmente o conhecimento acerca da doença está consolidado, e sabe-se que a hemofilia é uma coagulopatia de herança recessiva ligada ao sexo ocasionada por mutações no gene *F8*. Essa deficiência ocasiona sangramentos de difícil controle durante traumas ou de forma espontânea.

O gene *F8* contém 26 exons e um tamanho de 186 kb de comprimento. Está situado no braço longo do cromossomo X (posição física Xq28). Seu maior transcrito contém 9kb e a proteína resultante contém 2351aa, 21 dos quais perfazem o peptídeo sinal da proteína, e são clivados no retículo endoplasmático. A proteína FVIII está estruturada em três conjuntos de domínios estruturais (A, B e C) orientados da seguinte forma: NH<sub>2</sub>-A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2-COOH. Os domínios A e B estão separados por espaçadores curtos (regiões a1, a2 e a3) ricos em ácido aspártico e ácido

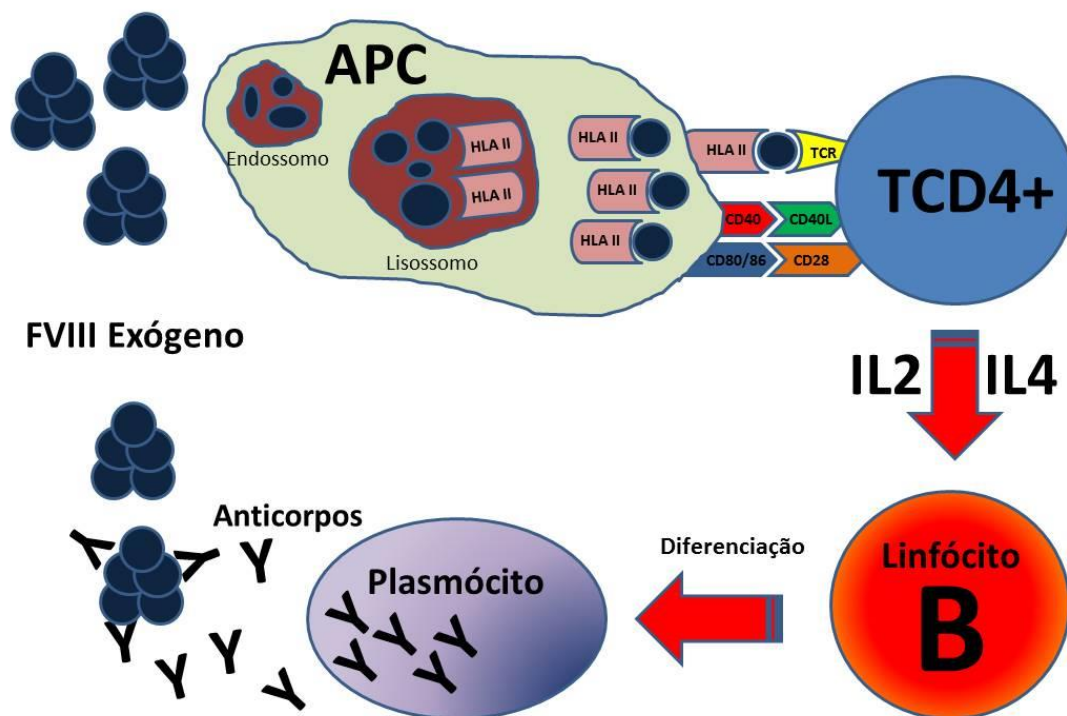
glutâmico. O FVIII circulante é secretado no plasma, principalmente pelos hepatócitos. Sua forma inativa é formada por um heterodímero associado não covalentemente, com uma cadeia pesada (A1-a1-A2-a2-B) contendo fragmentos variáveis de B, e uma cadeia leve (a3-A3-C1-C2). Essas cadeias se ligam via interação entre os domínios A1 e A3 e estabilizada por íons  $\text{Cu}^{2+}$ . A estabilidade do FVIII no plasma é aumentada por sua interação com o Fator Von de Von Willebrand (FvW) via domínios C1, C2 e a3. Durante a coagulação sanguínea, o FVIII é ativado (FVIIIa) por clivagem pela trombina nos resíduos Arg372 e Arg740 da cadeia pesada e em Arg1689 na cadeia leve (FANG *et al.*, 2007). O FVIII então se dissocia do FvW e forma um heterotrímero (A1/A2/A3-C1-C2) que se mantém ligado por interação entre A1 e A3 (SHEN *et al.*, 2008). Agora ativo, o FVIIIa se liga à um íon  $\text{Ca}^{2+}$ , à membranas fosfolipídicas carregadas negativamente e ao FIXa formando o complexo tenase, responsável pela ativação do fator X. Tal fato promoverá a formação de fibrina, proteína importante para estabilização do coágulo (FRANCO, 2001).

A hemofilia A é caracterizada pela deficiência quantitativa ou funcional do fator VIII. Uma das mutações mais frequentes é a inversão do íntron 22 do gene *F8*. Esta mutação acomete até cerca de 45% dos casos. Entre as outras mutações, estão deleções, inserções e mutações pontuais que levam a códons de parada ou troca de aminoácidos (BRASIL, 2006; MARGAGLIONE, CASTAMAN, MORFINI, ROCINO, SANTAGOSTINO, TAGARIELLO, TAGLIAFERRI, ZANON, BIOCCHI, CASTALDO, PEYVANDI, SANTACROCE, TORRICELLI, GRANDONE e MANNUCCI, 2008; LEE *et al.*, 2010). Este último grupo de mutações pode ocorrer em sítios de ligação do FVIII a outros componentes da cascata de coagulação e reduzir sua capacidade de interação e estabilidade. A hemofilia A é classificada de acordo com o nível residual do fator VIII presente no plasma (FVIII:Ag) e com sua atividade funcional (FVIII:C). Dessa maneira é classificada em hemofilia A grave (FVIII:Ag < 0,1 UI/ml; FVIII:C < 1 %), Hemofilia A moderada (FVIII:Ag > 0,1 UI/ml e < 0,5 UI/ml; 1% < FVIII:C < 5 %) e hemofilia leve (FVIII:Ag > 0,05 UI/ml e < 0,50 UI/ml; 5% < FVIII:C < 50%). A forma grave da doença é caracterizada por sangramentos espontâneos, enquanto que na forma leve da hemofilia os portadores costumam sofrer hemorragias pós-trauma ou pós-cirúrgica. A hemofilia moderada apresenta fenótipo intermediário. A hemofilia A grave é a mais

frequente, podendo responder por até 50 % dos casos de hemofilia (LEE *et al.*, 2010).

#### 1.4. Desenvolvimento de Anticorpos Inibidores

O principal evento adverso durante a terapia de reposição é o desenvolvimento de anticorpos inibidores do Fator VIII de coagulação. Este é um fenômeno dependente de células apresentadoras de antígenos e linfócitos T (ASTERMARK, 2006; WITMER e YOUNG, 2013). Inibidores são aloanticorpos policlonais do tipo IgG (IgG1 e IgG4) que neutralizam a atividade do FVIII exógeno (SANTOS, 2010a). O mecanismo exato de produção de inibidores ainda não está muito esclarecido, mas propõe-se que sua produção é iniciada quando células apresentadoras de antígenos endocitam o fator exógeno e o degrada em peptídeos. Por sua vez, esses peptídeos se ligam a moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (HLA) classe II. A partir de então são apresentados às células TCD4+ nos órgãos linfóides secundários (**Figura 1**). Paralelamente, pequenas porções de FVIII podem ser produzidos pelo paciente e apresentados via HLA classe I induzindo ativação e expansão clonal de células TCD8+. Nessa forma, os clones de linfócitos TCD4+ induzem os linfócitos B a produzirem auto-anticorpos por meio de interação de receptores CD40 com CD40L (REDING *et al.*, 2002; REDING *et al.*, 2003).



**Figura 1. Resposta imune inicial ao FVIII.**

Durante a terapia de reposição, o Fator VIII exógeno é fagocitado por células apresentadoras de antígenos (APC) que o degradam em peptídeos menores que são apresentados às células T via HLA classe II. Ocorre interação entre o complexo formado pelo antígeno e HLA com os receptores TCR e CD3 na célula T, caracterizando o sinal 1. Também há interação entre moléculas co-estimulatórias na superfície da APC (CD80/86 e CD40) com seus receptores correspondentes na célula TCD4+ (CD28 e CD40L) perfazendo o sinal 2. Agora ativadas, as células T produzem citocinas como IL-2 e IL-4 (Interleucinas-2 e 4), caracterizando o sinal 3 onde as citocinas liberadas ativam células B promovendo sua diferenciação em plasmócitos. Esses últimos são responsáveis pela produção de anticorpos inibidores. Figura redesenhada de SANTOS, 2010.

Os anticorpos desenvolvidos podem apresentar atividade inibitória ou não. São chamados de inibidores quando se ligam a epítopos de domínios importantes para a ação coagulante do FVIII. Esses epítopos estão nos domínios A2, A3 e C2. Estes epítopos funcionais incluem sítios para ligação de fosfolipídeos e dos fatores FIX e FvW (FULCHER *et al.*, 1985). Independentemente do tipo de mutação seja ela causadora de completa ausência ou alteração de um único aminoácido na proteína FVIII, o sistema imune de um indivíduo hemofílico poderá reconhecer o FVIII exógeno da terapia de reposição como uma molécula estranha e iniciar produção de anticorpos (SCOTT, 2014). Apesar disso, a minoria dos pacientes desenvolve

inibidores, o que pode ser explicado pela existência de certa homologia entre os fatores VIII e V de coagulação, induzindo certa tolerância (SCOTT, 2014).

### 1.5. Aspectos Imunológicos do Desenvolvimento de Inibidores

A maior parte dos inibidores é da classe IgG com síntese direcionada por células TCD4+ (WU *et al.*, 2001). Os anticorpos inibidores também podem ocorrer em indivíduos normais de forma transiente e reconhecem um ou mais domínios do FVIII, principalmente A1 e A3 (HU *et al.*, 2003). Em modelos de camundongos hemofílicos tratados com FVIII humano, o desenvolvimento de inibidores do fator VIII envolve uma ativação dominante de IFN- $\gamma$ , sugerindo uma polarização para resposta Th1. Todas as subclasses de anticorpos IgG anti-FVIII são encontradas nesse modelo (REIPERT *et al.*, 2001). Em humanos, ambas as respostas Th1 e Th2 induzem a síntese de anticorpos anti-FVIII em pacientes hemofílicos. Todavia, há maior predominância da resposta Th2 produzindo anticorpos do tipo IgG4 (REDING *et al.*, 2002; CHAVES, D. G. *et al.*, 2010). Nas células de indivíduos hemofílicos positivos para inibidores há uma maior produção de IFN- $\gamma$  e IL-4 quando expostos à fator VIII recombinante em comparação com hemofílicos que não produzem anticorpos inibidores e indivíduos normais. Em hemofílicos sem inibidores há um aumento modesto de IFN- $\gamma$  e TGF- $\beta$ 1, mas não há alteração nos níveis de IL-4 (HU *et al.*, 2007). Em indivíduos normais e hemofílicos sem inibidores, a resposta Th3 é mais pronunciada após estímulo com FVIII exógeno, enquanto que em indivíduos com inibidores a resposta é predominantemente Th1 e Th2 (HU *et al.*, 2007). Em células da imunidade inata (neutrófilos e monócitos), há maior produção de IL-5 e menor de TNF em indivíduos hemofílicos inibidores (+), comparado à inibidores (-) e controles. Em linfócitos (CD4+ e CD8+) de inibidores (-), há maiores níveis de IFN- $\gamma$ , TNF e IL-4. Hemofílicos inibidores (-) apresentam predominantemente subclasse de anticorpos anti-FVIII do tipo IgG1, enquanto que indivíduos inibidores (+) apresentam a subclasse IgG4. Análise do perfil de citocinas em leucócitos de sangue periférico revelou que em indivíduos hemofílicos inibidores (+) há uma polarização para uma resposta predominante de citocinas anti-inflamatórias e regulatórias. Em indivíduos não hemofílicos

não há polarização, e em indivíduos hemofílicos inibidores (-) também não ocorre polarização, mas há um leve desvio para perfil de citocinas pró-inflamatórias modulado por IL-4 (CHAVES, D. G. *et al.*, 2010).

Outro estudo verificou os níveis de citocinas anti e pró-inflamatórias em plasma de indivíduos normais, hemofílicos inibidores (-) e inibidores (+). O estudo encontrou que em indivíduos normais e inibidores (-) há produção semelhante de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2) enquanto que em hemofílicos inibidores (+) há menor produção dessas citocinas. Análises de citocinas anti-inflamatórias/regulatórias mostraram níveis similares de IL-5 em indivíduos não hemofílicos e hemofílicos inibidores (-). Em contrapartida, todos os grupos apresentam níveis próximos de IL-4 e IL-10, o que pode demonstrar a importância dessas citocinas na polarização da resposta imune para Th2 em indivíduos hemofílicos inibidores (+) (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Outro estudo encontrou que em pacientes inibidores (+) há um maior número de células Treg e maior concentração no plasma de citocinas IL-10 e TGF- $\beta$ , enquanto há redução de IL-2 e IFN- $\gamma$ , em comparação a hemofílicos inibidores (-) e indivíduos normais (DING *et al.*, 2014). Células Treg atuam inibindo resposta Th2, mais comum em inibidores (+). A alta produção de células Treg nesses pacientes deve ser resultante de uma tentativa do sistema imune de regular a alta resposta Th2. Sob essa perspectiva, moduladores de células Treg podem ter importante função no controle do desenvolvimento de inibidores (DING *et al.*, 2014). Como a maior parte da resposta imune que produz anticorpos é Th2, há maior produção de IL-10, que tem efeito supressor de células Th1, e maior estímulo de células B na produção de anticorpos IgG4 (DING *et al.*, 2014).

## **1.6. Fatores de Risco para o Desenvolvimento de Inibidores**

Os fatores de risco para desenvolvimento de inibidores são classificados em fatores genéticos e não genéticos. Entre os não genéticos, já foram descritos riscos como a idade de reposição, presença de histórico familiar, tipo de hemorragia e fator administrado (RAGNI *et al.*, 2009). O desenvolvimento de inibidores acomete cerca de 30% dos pacientes portadores da forma grave da doença. Ocorrem mais frequentemente nas primeiras 20 infusões e são mais



raros após 200 infusões. São mais comuns na faixa etária de 0 a 4 anos, e raro após cinco anos de idade (HAY *et al.*, 2011). Quanto maior a atividade de FVIII residual (FVIII:C) menor o título de inibidores (DING *et al.*, 2014).

Atualmente, sabe-se que negros são duas vezes mais propensos do que brancos para inibidores (VIEL *et al.*, 2007). Ainda existe controvérsia sobre a base genética deste fato. O estudo que forneceu essa hipótese avaliou 137 indivíduos saudáveis e pertencentes a populações diferentes quanto à origem geográfica identificando seis haplótipos formados por SNPs (do inglês, Single Nucleotide Polymorphism) rs35383156, rs2228152, rs1800291, rs1800297 no gene *F8*, conferindo assim a existência de seis tipos de proteína FVIII (nomeadas de H1 a H6). As frequências desses haplótipos são variáveis na população estudada. Indivíduos brancos apresentam apenas os haplótipos H1 e H2, enquanto que negros podem apresentar até cinco haplótipos, de H1 a H5. O haplótipo H6 é exclusivo de chineses (VIEL *et al.*, 2007; VIEL *et al.*, 2009).

Com base no fato de que os produtos de FVIII recombinantes utilizados na terapia de reposição correspondem em sua maioria aos haplótipos H1 e H2, é possível inferir que durante a terapia de reposição, hemofílicos negros estão mais propensos a receber um fator exógeno com haplótipo divergente de seu endógeno. Dessa forma, o sistema imune poderia reconhecer o produto da terapia de reposição como uma molécula estranha, e assim iniciar a produção de anticorpos inibidores (VIEL *et al.*, 2007; VIEL *et al.*, 2009). Em contrapartida, um grupo de pesquisa em Campinas também verificou a distribuição desses haplótipos na população brasileira. O estudo multicêntrico envolvendo hemocentros do Mato Grosso, Pernambuco, Paraná, Acre, e de Campinas, São Paulo, encontrou distribuições diferentes às relatadas por Viel e cols. Não foi encontrada associação entre haplótipos e inibidores, o que pode ser resultante da alta miscigenação da população brasileira entre caucasianos, negros e índios. Entretanto, esse estudo também encontrou que negros hemofílicos no Brasil são mais propensos a inibidores (SANTOS, 2010a).

Entre os fatores de risco genéticos, o fator mais bem descrito é a própria mutação causadora da hemofilia. As mutações com maior risco são as que levam a grandes alterações funcionais ou completa ausência do FVIII. Cerca de 40% de pacientes com largas deleções desenvolvem inibidores, enquanto

que mutações sem sentido respondem por até 30% dos acometidos (ZHANG *et al.*, 2009). A inversão do íntron 22 é a mutação mais frequente em hemofílicos e representa a terceira classe de mutações mais associadas a inibidores (GHOSH e SHETTY, 2009). Um estudo brasileiro recente verificou a prevalência de inibidores de 51% em hemofílicos portadores dessa mutação (LEIRIA *et al.*, 2009).

Na hemofilia A leve ou moderada, causada por mutações de sentido trocado, a prevalência de inibidores chega a 5% (ZHANG *et al.*, 2009). Para esse tipo de mutação, que ocasiona variação de um aminoácido ao longo da estrutura do FVIII, o risco será maior se a variante estiver em sítios imunogênicos. Sabe-se que mutações pontuais nos domínios A2 e C2 aumentam o risco de inibidores em até quatro vezes, quando comparado a pacientes com mutações fora dessas regiões. Já foi encontrada associação a inibidores com as mutações Arg<sup>593</sup>Cys do domínio A2, Ala<sup>2218</sup>Thr e Trp<sup>2229</sup>Cys do domínio C2 (HAY, 1998; HAY *et al.*, 1998; REPESSE *et al.*, 2007). Outros estudos encontraram associação à inibidores com as mutações Tyr<sup>2105</sup>Cys e Arg<sup>2150</sup>His do domínio C1 (FRANCHINI *et al.*, 2006).

Outros fatores de risco genéticos são polimorfismos em genes da resposta imune. Diversos estudos tem procurado estabelecer uma relação entre variantes da resposta imune e inibidores, mas poucos exibem significância estatística (ASTERMARK, OLDENBURG, CARLSON, *et al.*, 2006; ASTERMARK, OLDENBURG, PAVLOVA, *et al.*, 2006; ASTERMARK, WANG, OLDENBURG, BERNTORP, LEFVERT, *et al.*, 2007; BAFUNNO *et al.*, 2010). Já foi encontrada associação entre um polimorfismo do tipo microsatélite na região promotora do gene *IL10*, uma importante citocina regulatória. Essa variante consiste em uma repetição de dois nucleotídeos (CA). O alelo (CA)<sub>19</sub> foi associado à inibidores em hemofílicos A grave portadores cuja mutação é a inversão do íntron 22 (ASTERMARK, OLDENBURG, PAVLOVA, *et al.*, 2006). Recentemente um grupo brasileiro avaliou a influência de haplótipos conferidos por três polimorfismos SNP na região promotora da *IL10* (SNPs -1082 G/A, -819 T/C e -592 A/C). O estudo encontrou que indivíduos com o haplótipo GCC/ACC têm uma probabilidade 5,82 vezes maior de desenvolver inibidores, enquanto que o haplótipo GCC/ATA parece conferir proteção por ser mais frequente em no grupo de indivíduos hemofílicos sem inibidores (CHAVES, D.

*et al.*, 2010). Também foi encontrada associação entre um polimorfismo SNP no gene *CTLA4* (Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4), importante regulador de células T. Segundo o estudo, o alelo C/T na posição -318 de sua região promotora confere proteção ao desenvolvimento de inibidores (ASTERMARK, WANG, OLDENBURG, BERNTORP e LEFVERT, 2007; PAVLOVA *et al.*, 2008).

Apesar das divergências encontradas nesses estudos, todos convergem na afirmativa de que o desenvolvimento de inibidores é um fenômeno poligênico, envolvendo polimorfismos em genes da resposta imune e no gene *F8*. No contexto da resposta imune e de possíveis haplótipos para o FVIII, cada fator de risco ou proteção pode ser realidade para uma população específica. Assim, mais estudos são necessários para avaliar a verdadeira relação entre essas variantes e inibidores. Com relação à mutação causadora da hemofilia, já está bem estabelecido que quando maior o comprometimento da funcionalidade do FVIII, maior será o risco para inibidores. E essa informação é condizente com parâmetros clínicos dos pacientes. Sabe-se que inibidores são mais frequentes na forma grave da doença, que é resultante de mutações drásticas no gene *F8*, incluindo mutações sem sentido, largas deleções e inversões de íntrons, as três classes de mutações mais associadas à inibidores.

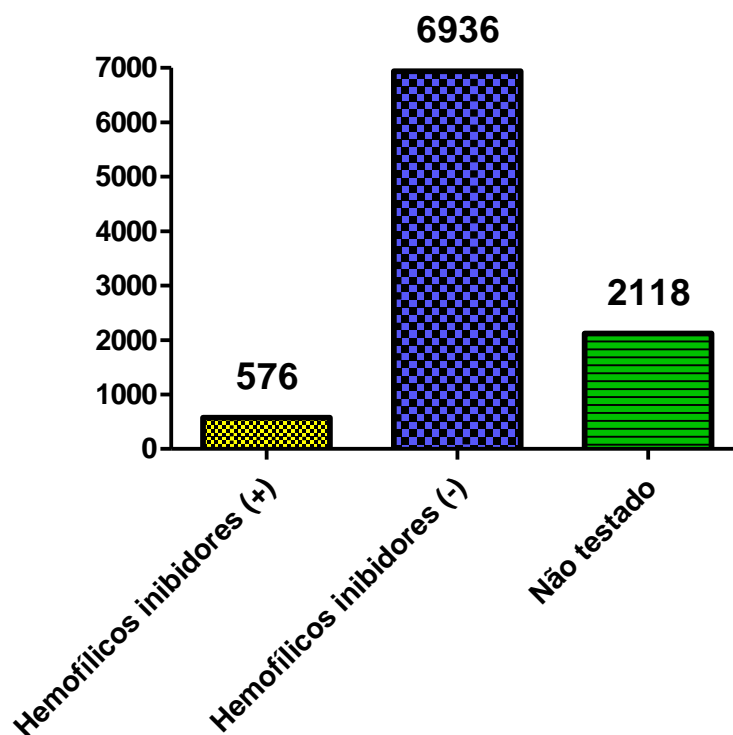
### **1.7. Diagnóstico de inibidores**

O diagnóstico de inibidores é realizado com teste de coagulação sanguínea *in vitro*. Previamente ao teste, é observado se existe suspeita clínica da presença de inibidores. A presença de inibidores manifesta-se clinicamente pelo aumento da tendência ao sangramento, aumento do consumo de concentrado de FVIII, redução da resposta ao tratamento habitual e ocorrência de episódios hemorrágicos de controle mais difícil. O diagnóstico em crianças é mais difícil, visto que os primeiros sinais são menos evidentes (BRASIL, 2006; 2009).

Após suspeita clínica inicial, é realizado o teste de coagulação sanguínea, conhecido como ensaio de inibidor de Bethesda, descrito inicialmente por Kasper e cols. em 1975 (KASPER *et al.*, 1975) e modificado

recentemente pelo protocolo de Nijmegen (VERBRUGGEN *et al.*, 1995), sendo amplamente utilizado e recomendado pela federação mundial de hemofilia (BRASIL, 2009). O método consiste em adicionar à amostra do paciente um mesmo volume de pool de plasma normal contendo imidazol atuando como estabilizador e tampão. Os inibidores são quantificados e descritos em números de unidades Bethesda (UB). Uma unidade Bethesda (1UB) corresponde à quantidade de anticorpos inibidores necessários para neutralizar 50% da atividade de FVIII plasmático. Quanto maior o número de unidades Bethesda maior será a quantidade de inibidores presentes no plasma do paciente. Valores inferiores a 5UB caracterizam o indivíduo como portador de baixo título de inibidores, enquanto que valores superiores classificam os hemofílicos como portadores de alto título.

No decorrer do tempo pode ocorrer variação de título de inibidores em um paciente, podendo desaparecer por completo em alguns meses sem novas reposições. Os inibidores podem surgir em até 150 dias de exposição ao FVIII exógeno. 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. (SCHWAAB *et al.*, 1995; ASTERMARK, 2006) Surgem após as primeiras infusões em até 150 dias de exposição ao FVIII exógeno. No Brasil em 2015 foram registrados 576 pacientes portadores de hemofilia A positivo para inibidores em teste de triagem (**Figura 2**) (BRASIL, 2017). Apesar da simplicidade, largo uso e aceitação, o teste de dosagem de inibidores apresenta algumas limitações, entre elas a inexistência de um padrão de referência para a dosagem de anticorpos e a dificuldade em detectar níveis baixos de inibidores (KEY, 2004).



**Figura 2: Prevalência de inibidor em 2015**

Prevalência de inibidor em 2015 de acordo com teste de triagem em pacientes com hemofilia A no Brasil (BRASIL, 2017).

### 1.8. Abordagem terapêutica na hemofilia com inibidor

A primeira abordagem utilizada em pacientes com inibidores consiste no aumento da quantidade de FVIII administrada, abordagem que é muito eficaz em hemofílicos com baixo título de inibidores. Nesses indivíduos, cuja forma de hemofilia predominante é a leve, pode-se também utilizar a desmopressina, substância análoga ao hormônio antidiurético e promove a liberação de FVIII e FvW de seus sítios de armazenamento intracelulares. Na hemofilia A grave, pode-se utilizar agentes que ativam a coagulação sanguínea em vias independentes do FVIII, como o complexo protrombínico inativo (CCP) ou ativado (CCPA), bem como fator VII recombinante (BRASIL, 2009). O uso de complexo protrombínico é eficaz na redução do quadro hemorrágico, entretanto o seu uso pode estimular excesso de coagulação e induzir formação de anticorpos inibidores visto que CCP e CCPA apresentam pequenas quantidades de FVIII em sua composição (BRASIL, 2009). Quanto ao fator VII, este é um produto mais caro e apresenta baixo tempo de ação, sendo

requerido para sua ação a aplicação de várias doses a cada 2 – 4 horas (BRASIL, 2009).

### **1.9. Novas perspectivas no tratamento**

Nos últimos anos, os avanços no tratamento de indivíduos hemofílicos têm reduzido drasticamente morbidade e mortalidades associadas à hemofilia. Por exemplo, a recente implementação de protocolo para indução de imunotolerância em indivíduos hemofílicos com inibidores representa um potencial avanço na terapia para esses pacientes (BRASIL, 2014). Graças a tal medida, hoje a indução de imunotolerância (IT), realizada também em outros países, tornou-se a principal alternativa no tratamento de hemofílicos com inibidores no Brasil. A IT consiste na infusão diária ou alternada de concentrado de FVIII, de forma a dessensibilizar o paciente. É eficaz na erradicação de inibidores em até 80% dos casos. Após a inibição da produção de inibidores por parte do paciente em resposta a IT, é possível retornar ao tratamento padrão com FVIII (BRASIL, 2014). Apesar de ser eficaz na maior parte dos pacientes tratados, existe uma parcela onde tal abordagem não é eficaz, e também não existem protocolos de profilaxia para erradicação de inibidores em hemofílicos. Desta maneira, têm surgido novas abordagens ainda em fase de pesquisa, para tentar erradicar a formação de inibidores (SHERMAN *et al.*, 2017).

Entre as novas abordagens, há o uso de terapia gênica para indução de células Treg e supressão de células T efetoras ou reimplante de células B modificadas *ex vivo* (LEI e SCOTT, 2005; LIU *et al.*, 2011). Também pode-se fazer indução *ex vivo* de células Treg e subsequente reimplantação (SARKAR *et al.*, 2014). É possível também a indução de imunotolerância através da administração concomitante de FVIII com rapamicina, com intuito de aumentar a produção de células Treg e reduzir células T efetoras pela inibição de vias associadas a mTOR (MOGHIMI *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2016). Apesar dessas abordagens encontrarem-se em fase pré-clínica em modelos animais experimentais, representam um novo horizonte para o tratamento de hemofilia e apresentam novas alternativas para a erradicação de inibidores (SHERMAN *et al.*, 2017; BALKARANSINGH e YOUNG, 2018).

## **2. Hipótese de Trabalho**

Sítios CpG em genes da resposta imune apresentam variabilidade em indivíduos hemofílicos com inibidores em comparação a hemofílicos sem inibidores, respondendo por parte da variabilidade imunológica encontrada.

## **3. Justificativa**

Atualmente a metilação do DNA no contexto de sítios CpG é a marca epigenética mais bem caracterizada. Entre suas funções, responde principalmente pela repressão ou ativação da transcrição. Durante a hematopoese, os perfis diferenciados de metilação determinam estados de expressão ou silenciamento gênico. Em relação aos genes da resposta imune, sua expressão é dependente do estabelecimento de programas de destino celular e adaptação às condições variantes do ambiente. Nesse contexto, a metilação é um dos mecanismos chave reguladores da expansão clonal de subtipos celulares e produção de citocinas, caracterizando polarização de repostas. Assim, é possível inferir que um mesmo indivíduo exibe padrões de metilação divergentes no decorrer de sua vida. Apesar dessa flutuabilidade de marcas de metilação, estudos de caso-controle têm encontrado padrões únicos de indivíduos acometidos por determinadas doenças quando comparados a indivíduos saudáveis. Atualmente é desconhecida a contribuição da metilação do DNA para a produção de anticorpos inibidores na terapia de reposição do fator VIII em hemofílicos. A proposta do presente trabalho foi interrogar sítios de metilação únicos ou ilhas CpG de genes da resposta imune para verificar se alguma marca ou conjunto de marcas são únicas de hemofílicos positivos para inibidores. Assim, foi possível avaliar se o estado de metilação de determinado ponto têm valor diagnóstico e (ou) prognóstico durante a terapia de reposição.

#### **4. Objetivo Principal**

Identificar marcadores epigenéticos de propensão ao desenvolvimento de inibidores do Fator VIII exógeno na terapia de reposição em pacientes acometidos por hemofilia A.

##### **4.1. Objetivos Específicos**

4.1.1. Desenhar ensaios de Digestão Enzimática Sensível à Metilação associada à PCR quantitativa fluorescente (DESM-QFPCR) para os novos *loci* analisados;

4.1.2. Determinar os perfis pontuais de metilação nos sujeitos da pesquisa;

4.1.3. Determinar os riscos epigenéticos de desenvolvimento de inibidores (estudo caso/controle) segundo os perfis de metilação (hipometilado, hipermetilado e metilação intermediária);



## 5. Materiais e Métodos

### 5.1. Genes Alvo e Estratégia de Análise

A metilação é uma das principais marcas epigenéticas estudadas. Alterações em seu padrão têm sido associadas a diversas doenças do sistema imune. Foi escolhida a região promotora dos genes alvo com base em dados da literatura mostrando que essa região é passível de regulação por metilação em diversos processos imunológicos, incluindo polarização de resposta Th1/Th2 e produção de citocinas (MOLINOS QUINTANA *et al.*, 2008). Já foi demonstrado também que o estado de metilação em um único sítio CpG na região promotora da IL-2 é capaz de alterar a expressão desse gene (MURAYAMA *et al.*, 2006). Com base na literatura consultada, foram selecionados 10 genes (**Tabela1**) atendendo aos seguintes critérios: **1)** gene com presença de variantes alélicas descritas com possível associação ao risco de desenvolvimento de inibidores (*IL1B*, *IL6*, *IL10*, *TNF* e *CTLA*) (ASTERMARK, OLDENBURG, CARLSON, *et al.*, 2006; ASTERMARK, OLDENBURG, PAVLOVA, *et al.*, 2006; ASTERMARK, WANG, OLDENBURG, BERNTORP e LEFVERT, 2007; LOZIER *et al.*, 2011; REPESSE *et al.*, 2013); **2)** genes com expressão diferencial em indivíduos com inibidores (*IL8*) (SANTOS, 2010b; HWANG *et al.*, 2012); **3)** genes codificantes de citocinas cuja dosagem protéica das mesmas apresente alteração em indivíduos com inibidores (*IFNG* e *IL4*) (OLIVEIRA *et al.*, 2013); **4)** genes com função moduladora na resposta imune mediada por anticorpos ou imunidade Inata (*CD28* e *IL2*).

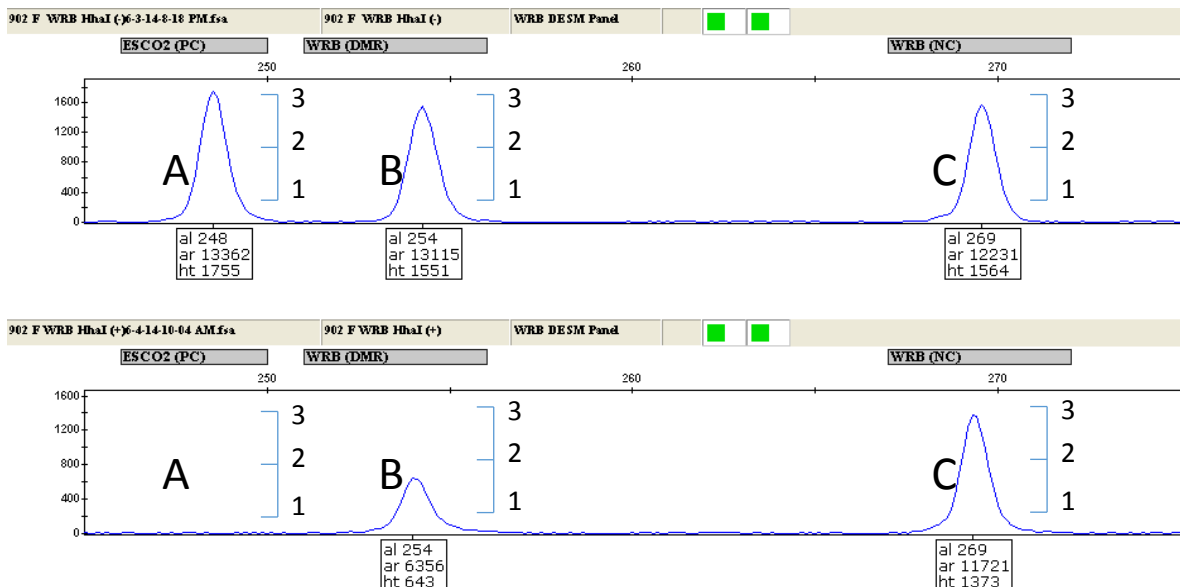
Os genes alvo são de citocinas, receptores, enzimas, fatores de transcrição e ligantes de reconhecimento celular. Os mesmos foram avaliados em nível de metilação pontual e marcadores microssatélites ao longo do gene, incluindo 5kb na região 5' utilizando o programa *Tandem Repeat Finder*, seguindo critérios estabelecidos na literatura (MACHADO e MEDINA-ACOSTA, 2009). Todos os genes alvo terão suas regiões promotoras interrogadas quanto ao estado de metilação pontual em sítios CpG através do ensaio de digestão

enzimática sensível à metilação seguida de PCR quantitativo fluorescente (DESM-QFPCR).

**Tabela 1:** Genes selecionados da literatura quanto à associação com inibidores e regulação de região promotora por metilação,

<b>Gene</b>	<b>Associação com inibidores</b>	<b>Regulação do promotor por metilação</b>
<i>IL1B</i>	(LOZIER <i>et al.</i> , 2011)	(HASHIMOTO <i>et al.</i> , 2009)
<i>IL2</i>	(LOZIER <i>et al.</i> , 2011)	(MURAYAMA <i>et al.</i> , 2006)
<i>IL4</i>	(HU <i>et al.</i> , 2007)	(KWON <i>et al.</i> , 2008; MI e ZENG, 2008)
<i>IL10</i>	(ASTERMARK, OLDENBURG, PAVLOVA, <i>et al.</i> , 2006)	(SZALMAS <i>et al.</i> , 2008)
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	(ASTERMARK, OLDENBURG, CARLSON, <i>et al.</i> , 2006)	(CAMPION <i>et al.</i> , 2009; GOWERS <i>et al.</i> , 2011; HERMSDORFF <i>et al.</i> , 2013)
<i>CTLA4</i>	(ASTERMARK, WANG, OLDENBURG, BERNTORP e LEFVERT, 2007)	(CRIBBS <i>et al.</i> , 2014)
<i>IL8</i>	(HWANG <i>et al.</i> , 2012)	(DIMBERG <i>et al.</i> , 2012)
<i>IFNG</i>	(HU <i>et al.</i> , 2007)	(WHITE <i>et al.</i> , 2002; KWON <i>et al.</i> , 2008)
<i>IL6</i>	(DE ALENCAR <i>et al.</i> , 2015)	(NILE <i>et al.</i> , 2008)
<i>CST7</i>	(SANTOS, 2010a)	-

A figura 3 mostra como funciona o ensaio DESM-QFPCR. Para avaliar o padrão de metilação, foram feitas amplificações das regiões alvo contendo sítios de digestão para enzimas sensíveis à metilação, como HpaII, HhaI, HpyCH4IV e Acil. As regiões de interesse foram comparadas com regiões sabidamente não metiladas e hipermetiladas. A análise da desproporção entre os picos possibilitou inferir se o promotor do gene alvo está hipometilado (nível 1, figura 3), hipermetilado (nível 3, figura 3) ou hemimetilado (nível 2, figura 3).



**Figura 3: Padronização do ensaio DESM-QFPCR.**

Eletoferogramas representativos do ensaio de digestão enzimática sensível a metilação para 1 amostra com marcador de região diferencialmente metilada. Nesse ensaio são analisadas 3 regiões no gene de interesse. A é representativo de uma região sempre hipometilada; B: região que se quer avaliar quanto ao estado de metilação; C: região sempre hipermetilada. Painéis superior e inferior representam, respectivamente, amostra antes e após digestão com enzima de restrição sensível à metilação. Os níveis 1, 2 e 3 representam a altura dos picos. Observe que após a digestão A sempre cai para nível 1 e C sempre se mantém no nível 3.

## 5.2. Tipo de Estudo

Estudo observacional analítico do tipo caso/controle (com inibidor/sem inibidor) envolvendo pacientes com HA severa, estratificada, genotipados quanto às mutações patogênicas. O banco de DNA genômico consiste de uma população argentina de pacientes do sexo masculino com HA estratificada com relação ao tipo de mutação causativa. Foram avaliados até 40 pacientes com HA severa causada por Inv22 para cada alvo testado (tabela 2), classificadas respeito ao *status* de inibidor em: indivíduos positivos para inibidores (Inh(+)) (N=20) (incluindo casos com elevada resposta, >5 UB/mL, e baixa resposta, <5 UB/mL) e indivíduos negativos para inibidores (Inh(-)) (N=20) (incluindo casos negativos, <0.5UB/mL, e transientes, cujos títulos de inibidor desaparecem antes de um período de seis meses) (tabela 3). Também foram avaliados indivíduos argentinos não hemofílicos (NH) do sexo masculino e não aparentados (tabela 4). Foram avaliados sítios CpG únicos nos

genes da resposta imune, contendo sítios alvo para enzimas de restrição sensíveis à metilação. Os perfis pontuais de metilação (níveis de metilação em sítios CpG únicos) foram determinados por Digestão Enzimática Sensível à Metilação associada à PCR quantitativa fluorescente. A limitação do estudo é o baixo número de amostras para alguns dos alvos testados.

**Tabela 2:** Relação de amostras testadas por alvo para os grupo Inh(+), Inh(-) e NH

<b>Alvos</b>	<b>Inh(+)</b>	<b>Inh(-)</b>	<b>NH</b>
<b><i>IL4DESM1</i></b>	20	20	19
<b><i>IL4DESM2</i></b>	20	19	20
<b><i>IL4DESM3</i></b>	16	18	20
<b><i>IL2</i></b>	10	10	8
<b><i>IL10</i></b>	10	8	10
<b><i>CST7</i></b>	20	19	20
<b><i>CD28</i></b>	10	10	10
<b><i>IFNG</i></b>	9	10	10
<b><i>IL1B</i></b>	10	10	8
<b><i>TNF</i></b>	10	10	10
<b><i>IL6</i></b>	20	20	20
<b><i>CTLA4 779</i></b>	10	10	10
<b><i>CTLA4 243</i></b>	10	10	10

**Tabela 3:** Relação de amostras quanto à mutação, idade e status de inibidores em portadores de hemofilia

<b>Código ID</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Status de Inibidor</b>	<b>Mutação</b>
1	19	+(HR)	Inv22-1
2	24	-	Inv22-1
65	19	- (transiente)	Inv22-1
66	21	-	Inv22-1
123	25	-	Inv22-1
125	27	+(HR)	Inv22-1
131	30	-	Inv22-1
266	12	-	Inv22-1
298	10	-	Inv22-1
466	20	+(HR)	Inv22-1
501	10	+(HR)	Inv22-1
508	32	+(HR)	Inv22-1
522	24	+(HR)	Inv22-1
537	12	-	Inv22-2
600	7	+(HR)	Inv22-1
610	5	+(HR)	Inv22-1
642	5	+(HR)	Inv22-1
654	3	+(HR)	Inv22-1
666	10	+(HR)	Inv22-1
737	15	-	Inv22-1
756	8	-	Inv22-2
757	3	-	Inv22-2
764	2	-	Inv22-1
773	1	+(LR)	Inv22-1
826	16	-	Inv22-1
854	2	+HR	Inv22-1
879	17	+HR	Inv22-1
885	46	+HR	Inv22-1
893	1	-	Inv22-1
913	5	-	Inv22-1
958	2	+(HR)	Inv22-2
961	10	+(HR)	Inv22-1
985	2	+HR	Inv22-2
1017	2	-	Inv22-1
1048	18	-	Inv22-1
1055	2	+(HR)	Inv22-2
1080	2	-	Inv22-1
1085	1	-	Inv22-1
1109	4	+(HR)	Inv22-1
1145	51	-	Inv22-1

**Tabela 4:** Relação de amostras quanto à data de aquisição e idade em indivíduos não hemofílicos

<b>Código de identificação</b>	<b>Data de aquisição</b>	<b>Idade (anos)</b>
CN30	5/23/2011	49
CN33	5/23/2011	42
CN4	9/29/2010	42
CNv107	5/26/2011	32
CNv110	5/26/2011	79
CNv125	5/26/2011	39
CNv138	5/26/2011	26
CNv143	5/26/2011	59
CNv148	5/26/2011	57
CNv154	5/26/2011	69
CNv161	5/26/2011	68
CNv163	5/26/2011	7
CNv180	5/26/2011	39
CNv181	5/26/2011	79
CNv184	5/26/2011	65
CNv186	5/26/2011	58
CNv213	5/26/2011	45
CNv236	5/26/2011	54
CNv242	5/26/2011	78
CNv44	5/26/2011	59

### **5.3. Aspectos Éticos**

A criação do banco de DNA genômico foi realizada em um único centro pela contraparte na Argentina, cujo protocolo foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa em Seres Humanos da Instituição executora na Argentina. O protocolo de amostragem tipo conveniência relativa aos objetivos da proposta Brasileira faz parte da grande linha de pesquisa intitulada “Desenvolvimento de testes moleculares rápidos, altamente eficientes e econômicos para o diagnóstico de doenças genéticas humanas: Fortalecendo a interiorização da Genética no SUS”, cujo projeto geral foi aprovado pela Comissão Regional de Ética em Seres Humanos. Todas as amostras da população brasileira foram coletadas mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos participantes ou responsáveis legais. A coleta foi feita por profissional autorizado ou remetida por especialistas que referenciam o estudo. O estudo populacional (amostragem por conveniência) envolveu a genotipagem de 10 a 20 indivíduos não hemofílicos, 10 a 20 hemofílicos positivos para inibidores e 10 a 20 hemofílicos negativos para inibidores, para cada alvo testado.

### **5.4. Extração de DNA**

DNA genômico foi extraído de amostras de sangue periférico e/ou esfregaço bucal (swab) utilizando o kit de extração e purificação de DNA, RNA e proteínas Allprep DNA RNA Protein Mini Kit TM(QIAGEN) conforme as especificações do fabricante.

### **5.5. Caracterização dos Alelos Amplificados**

Aos produtos de amplificação foram adicionados formamida (Hi-Di Formamida, Applied Biosystems) e o padrão de massa molecular GeneScan 500, marcado com o fluorocromo LIZ<sup>TM</sup> (fluorescência laranja) (Applied Biosystems). Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese capilar com o polímero POP4, utilizando a plataforma ABI Prism<sup>TM</sup> 310 Genetic Analyzer. Os perfis

eletroforéticos foram analisados utilizando os programas GeneScan™ e Genotyper™ (Applied Biosystems).

## 5.6. Determinação dos Perfis Pontuais de Metilação

Os perfis pontuais de metilação (níveis de metilação em sítios CpG únicos) foram determinados por Digestão Enzimática Sensível à Metilação associada à PCR quantitativa fluorescente (DESM-QFPCR), metodologia desenvolvida pelo colaborador deste projeto Dr. Filipe Brum Machado para avaliação de imprinting no cromossomo 11. Esse é um ensaio baseado nos princípios da MS-MLPA (Methylation-specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), porém em menor escala. Brevemente, o ensaio é composto primeiramente por um par de iniciadores que abrange uma região no contexto de CGIs, contendo pelo menos um sítio de reconhecimento para enzimas de restrição sensíveis à metilação. Também é composto por um segundo par de iniciadores (utilizado como controle negativo), que ancora fora da CGIs e cujo produto de amplificação não contém sítios de reconhecimento para enzimas de restrição sensíveis à metilação. Os iniciadores de sentido direto são marcados com um fluorocromo para visualização e quantificação por eletroforese capilar em analisador genético ABI310. A proporção de sítios de restrição metilados/não metilados será calculada pelo câmbio das áreas dos picos (alelos) amplificados a partir de amostras de DNA genômico antes da digestão e depois da digestão com as enzimas de restrição susceptíveis à 5meC, computando o fator de correção utilizado como descrito para quantificação de inativação do cromossomo X. Para o presente projeto foram selecionados *in silico* alvos monomórficos de 150pb ou 440pb de comprimento, localizados em regiões promotoras de genes alvo, que mapeiem em CGIs e que contenham pelo menos um sítio de restrição susceptível à 5meC. Como amplicons controles (resistentes à digestão enzimática) foram amplificados (em reação bplex) alvos monomórficos de 160pb ou 450pb (isto é, 10pb mais longos do que os alvos com sítios de restrição susceptíveis à 5meC) selecionados nos mesmos locais, porém que não contenham sítios de restrição susceptíveis à 5meC. Os perfis pontuais de metilação do alvo menor (150pb ou 440) foram classificados como não metilado, hipometilado e hipermetilado, estimando a proporção da digestão do alvo menor (150pb ou 440pb) em relação ao alvo major (160pb ou 450pb) a partir de amostras de DNA



genômico submetidas ou não a digestão com enzimas de restrição susceptíveis à 5meC. O ensaio de digestão enzimática sensível à metilação foi realizado conforme especificações do fabricante, sendo utilizadas as enzimas HpAII, HpyCHIV4 e Acil. Para reação em cadeia da polimerase, foram utilizadas as seguintes condições:

- Temperatura de anelamento dos iniciadores: 59°C;
- Concentração de Cloreto de magnésio: 1mM (milimolar);
- Número de ciclos: 32 ciclos;
- Concentração de DNA: 20ng (nanogramas);
- Concentração de iniciadores: 4,44 pmol (picomol).

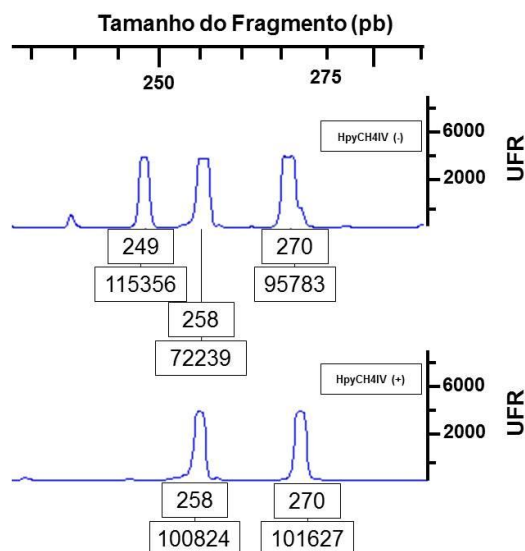
### **5.7. Análise Estatística e figuras**

As hipóteses de associação foram testadas sob tabelas de contingência do tipo Caso (pacientes com inibidor, estratificados pela resposta alta ou baixa) versus Controle (pacientes sem inibidor, estratificados em negativos ou transientes) utilizando a estatística do  $\chi^2$  com correção de Yates e Fisher exato no software GraphPad Prism 4.0 y/o SPSS 17. Os riscos relativos foram calculados para cada polimorfismo com respectivos intervalos de confiança 95%. As figuras de análise de associação foram feitas com o programa Graph Pad Prism, e as figuras de nível de metilação com o software de estatística R versão 3.5.0.

## 6. Resultados e Discussão

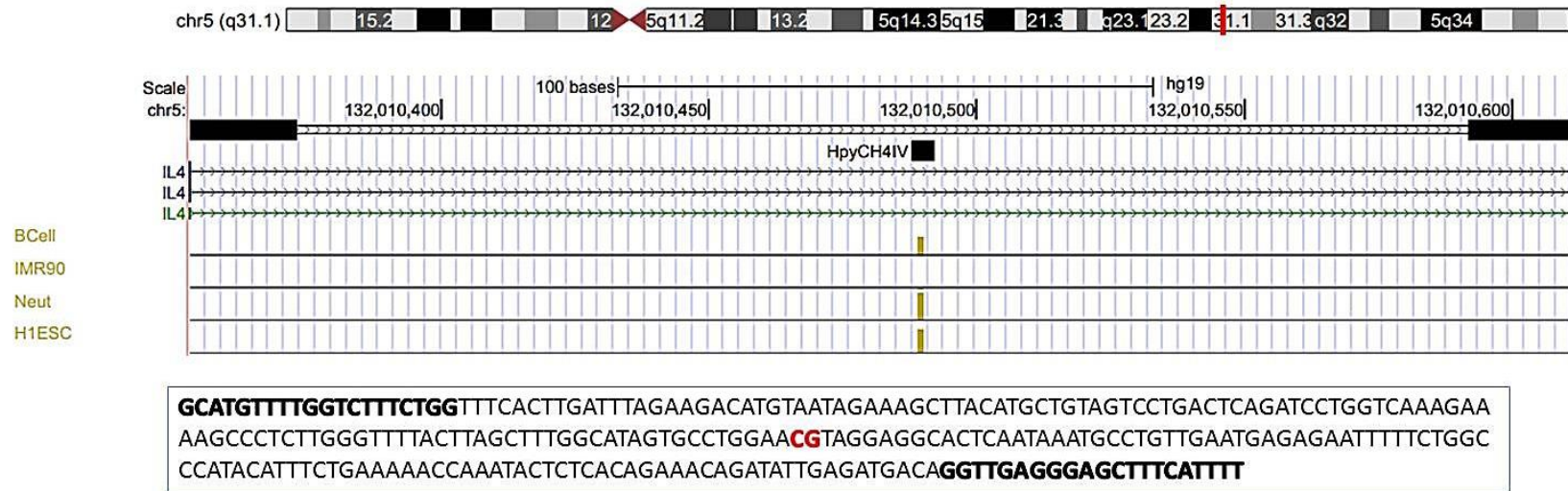
### 6.1. Padronização dos ensaios DESM-QFPCR

Foi realizada padronização inicial para verificar em quais condições o par de iniciadores da região alvo funcionam. A seguir, o mesmo foi testado em um ensaio tríplex (três pares de iniciadores por reação) para desenvolvimento do ensaio DESM-QFPCR para avaliação de sítios CpGs diferentes nos genes de interesse (figura 4). Também foram avaliados *in silico* os respectivos estados de metilação desses sítios CpG em quatro linhagens celulares diferentes com base em banco de dados de acesso público depositados no Genome Browser UCSC para todos os alvos testados, sendo exemplificado aqui para o alvo em *IL4*. Em um primeiro ensaio foram avaliados três sítios CpG distintos contendo sítios para as enzimas HpaII e HpyCH4IV. A região contendo os alvos apresenta um fragmento de 258 pb, o controle negativo com 270 pb e controle positivo com 249 pb (figura 4). O estado de metilação encontrado se assemelha ao controle negativo de digestão, sendo um indício de que a região avaliada está hipermetilada. Avaliando as áreas dos picos antes e após a digestão, é possível confirmar esse achado. Tal resultado é concordante com o estado de metilação verificado *in silico* em quatro linhagens celulares diferentes (figura 5). Os iniciadores de todos os alvos de metilação em nosso estudo encontram-se na tabela 5.



**Figura 4: Eletroferograma representativo do ensaio DESM-QFPCR.**

Eletroferograma representativo do ensaio DESM-QFPCR para um sítio CpG no Gene *IL4*. Posição do pico no eixo x representa o tamanho do fragmento. Nas caixas de texto sob os picos estão o tamanho do fragmento em pb e a área do pico. Altura do pico (eixo y) representa a intensidade da amplificação em unidades de fluorescência relativa (UFR). No painel superior está uma amostra de DNA controle sem digestão com enzima de restrição sensível à metilação (Enzima HpyCH4IV). Neste painel é possível identificar o controle positivo de digestão em 249pb, o controle negativo em 270pb e a região alvo contendo um sítio CpG com fragmento de 258pb. Após digestão com HpyCH4IV (painel inferior) é possível notar que o pico referente ao controle positivo de digestão desaparece, como esperado, e a região alvo se apresenta metilada, em comparação ao controle negativo.



**Figura 5: Dados do UCSC Genome Browser quanto à região de 258 pb avaliada no gene IL4.**

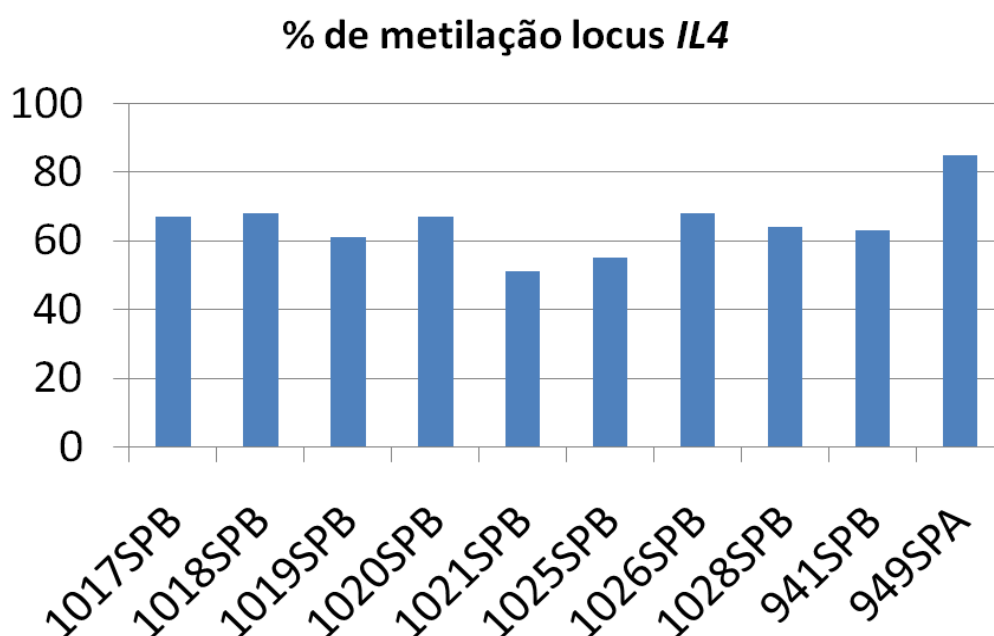
Na parte superior da figura está a posição física dessa região no cromossomo 5. Seguido, está a escala em pares de base da região visualizada. É mostrado um sítio de digestão da enzima de restrição HpyCH4IV. Este sítio para enzima permite avaliar o estado de metilação em um sítio CpG. Nas linhas inferiores está indicada a posição do dinucleotídeo CpG sujeitos à metilação em quatro linhagens celulares diferentes, sendo BCell (Células B), IMR90 (fibroblasto), Neut (neutrófilos) e H1ESC (células embrionárias). Na parte inferior da figura está a sequência da região avaliada destacando em negrito os iniciadores direto e reverso, e em vermelho o sítio CpG susceptível à metilação.

**Tabela 5. Iniciadores para o ensaio DESM com os genes alvo e o controle negativo de digestão**

Gene	Iniciador Direto*	Iniciador Reverso	Enzima / amplificação	Posição física do alvo
<i>IL4 DESM 1</i>	<b>FAM</b> -AACTGCTTCCCCCTCTGTTC	CTTGGAGGCAGCAAAGATGT	HpaII, HpyCH4IV / 440pb	chr5:132,009,947-132,009,948
<i>IL4 DESM 2</i>	<b>FAM</b> -GCATGTTTTGGTCTTTCTGG	AAAATGAAAGCTCCCTCAACC	HpyCH4IV / 260pb	chr5:132,010,490-132,010,491
<i>IL4 DESM 3</i>	<b>FAM</b> -TCCATAATGAACCTCAAATACCTC	AAGGGCAGCTTTAGTGCAAG	HpaII, HpyCH4IV / 440pb	chr5:132,013,185-132,013,186
<i>IL6</i>	<b>FAM</b> -CAGTGGCTTCGTTTCATGC	GTGACCTCTGTTGGGCATTT	HpyCH4IV / 260	chr7:22,765,236-22,765,237
<i>Controle negativo</i>	<b>FAM</b> -GAGGCAGGAGAACACTGGAG	AAGGACTTCTGCCCCCTAAT	NE / ampli 450	chr5:132,016,949-132,017,398
<i>IL1B</i>	<b>FAM</b> -TCACAATCAAGTTAAAGGAAAGG	GTCTTCCACTTTGTCCCACA	HpyCH4IV / 260	chr2:113,594,654-113,594,655
<i>IL2</i>	<b>FAM</b> -ACATGCATGGGTACTTTACAAAT	AGGCCACAGAACTGAAACATC	HpyCH4IV / 260	chr4:123,374,885-123,374,886
<i>IL10</i>	<b>FAM</b> -AGCTGTGCATGCCTTCTTTT	TCTGGAATGGGCAATTTGT	HpaII, HpyCH4IV / 440pb	chr1:206,946,187-206,946,188
<i>CST7</i>	<b>FAM</b> -ACCCATGGCTGGCAGAAG	ACCACCCAGGAAAATGACG	HpaII, HpyCH4IV / 440pb	chr20:24,931,707-24,931,708
<i>TNF</i>	<b>FAM</b> -GGCAGGTTCTTCTCCTCTCA	GGCACTCACCTTCCCTCT	HpaII, HpyCH4IV / 260pb	chr6:31,543,545-31,543,546
<i>IFNG</i>	<b>FAM</b> -TTAAGCCAAAGAAGTTGAAATCAG	ACACCCAAATGCCACAAAAC	HpaII, HpyCH4IV / 440pb	chr12:68,553,577-68,553,578
<i>CTLA4 243</i>	<b>FAM</b> -ATCTGTGGTGGTCGTTTTCC	ATTTCAAGGAGGAGATCAAAA	Acil / 440pb	chr2:204,739,001-204,739,002
<i>CD28</i>	<b>FAM</b> -GCAAATGAAGTTATGTATCCTCCT	TCTTCTGAGTCTTAACCCATTAGA	Acil / 440pb	chr2:204,591,638-204,592,077
<i>CTLA4 779</i>	<b>FAM</b> -AATTGGATCATGGGGGACTC	TCCCTGGCATTGTTGTAGAG	Acil / 440pb	chr2:204,734,588-204,734,589

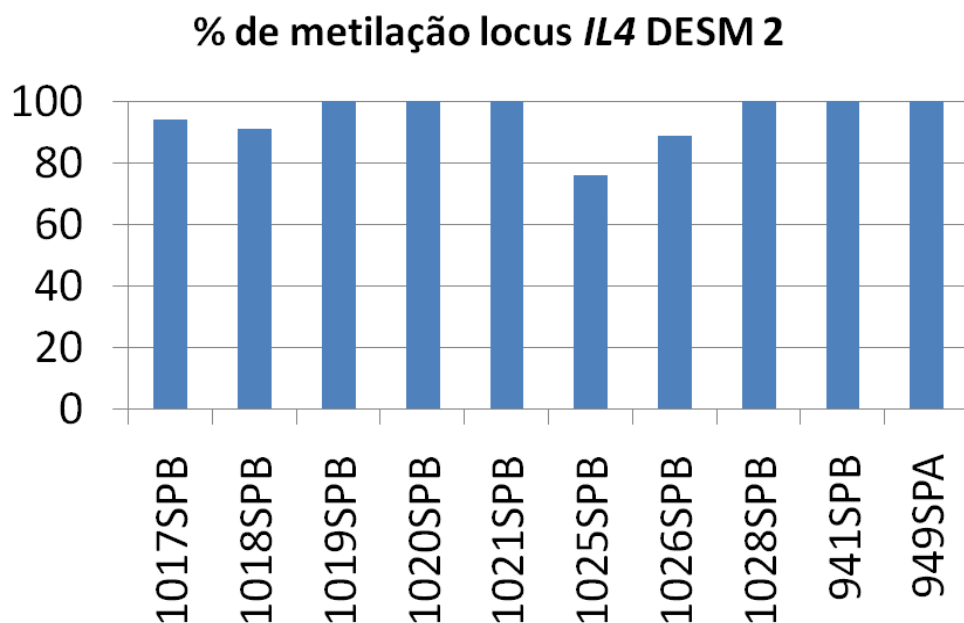
\*Prefixo FAM representa iniciador marcado com fluoróforo azul.

Foram testados três sítios de metilação diferentes no gene *IL4* (figuras 6, 7 e 8). Dois apresentaram estado hipermetilado, próximo de 100% de metilação (figuras 7 e 8) enquanto o outro apresentou estado intermediário de metilação próximo de 50% (figura 6). Também foi verificado estado de metilação intermediária para alvos únicos nos genes *IL6*, *CST7* e *IL10*. Foi verificado estado de hipometilação (próximo de 0%) para sítios únicos nos genes *IL1B*, *TNF* (figura 9) e *IL2*. Para o alvo em *IFNG* foi encontrado estado de hipermetilação. Todos os perfis encontrados apresentam concordância com dados de metilação verificados *in silico* em bancos de dados de acesso público (UCSC-Genome Browser).



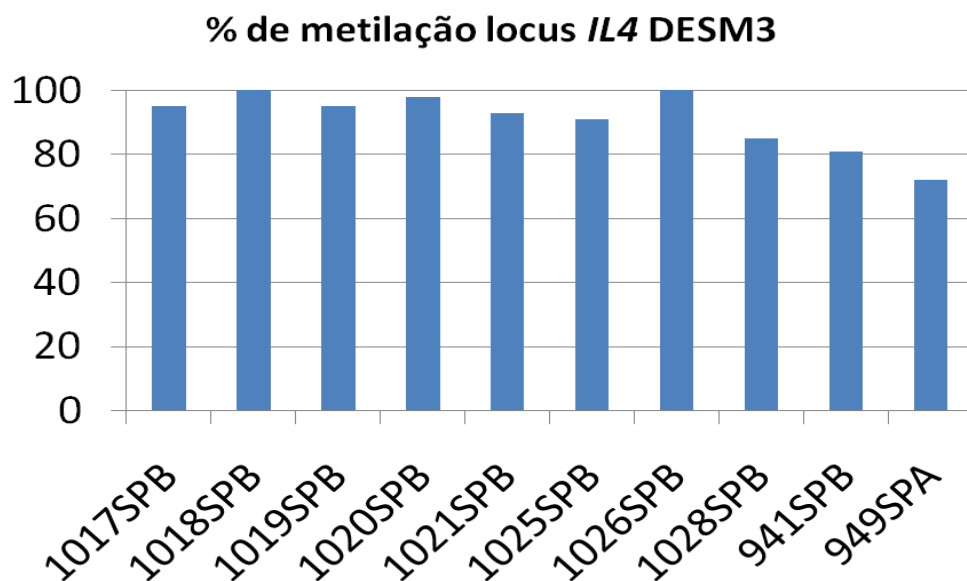
**Figura 6: Porcentagens de metilação para um sítio CpG no gene *IL4* em 10 amostras de homens saudáveis não relacionados.**

Todos apresentaram estado intermediário de metilação (próximo de 50%).



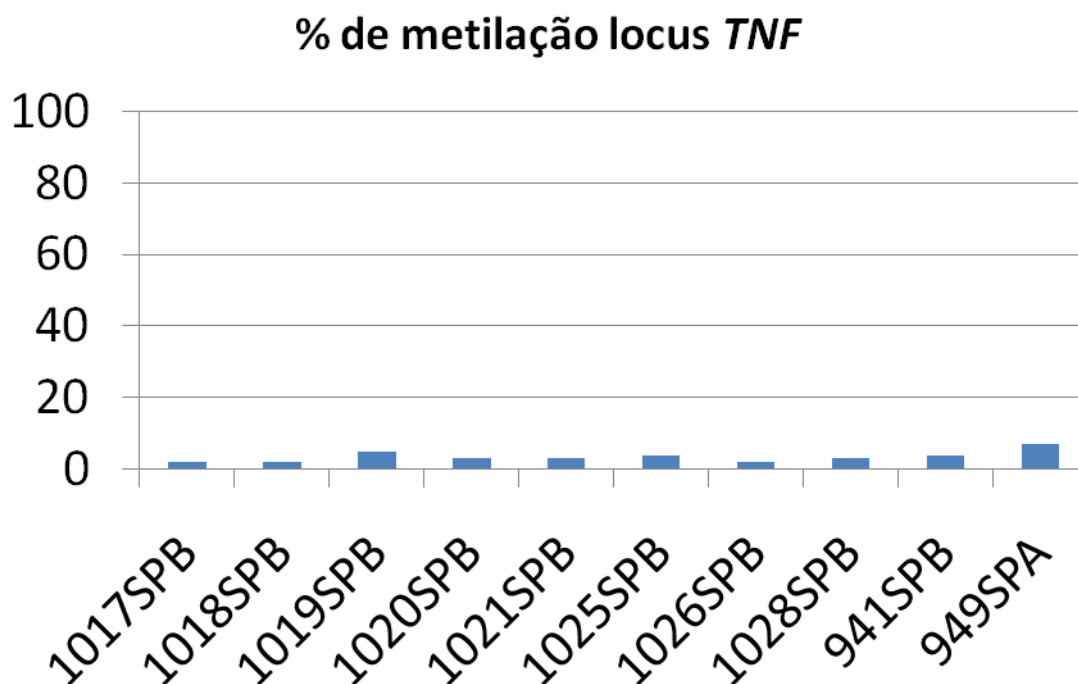
**Figura 7: Porcentagens de metilação para um segundo sítio CpG no gene *IL4* em 10 amostras de homens não relacionados.**

Todos apresentaram estado hipermetilado (próximo de 100%).



**Figura 8: Porcentagens de metilação para um terceiro sítio CpG no gene *IL4* em 10 amostras de homens não relacionados.**

Todos apresentaram estado hipermetilado (próximo de 100%).



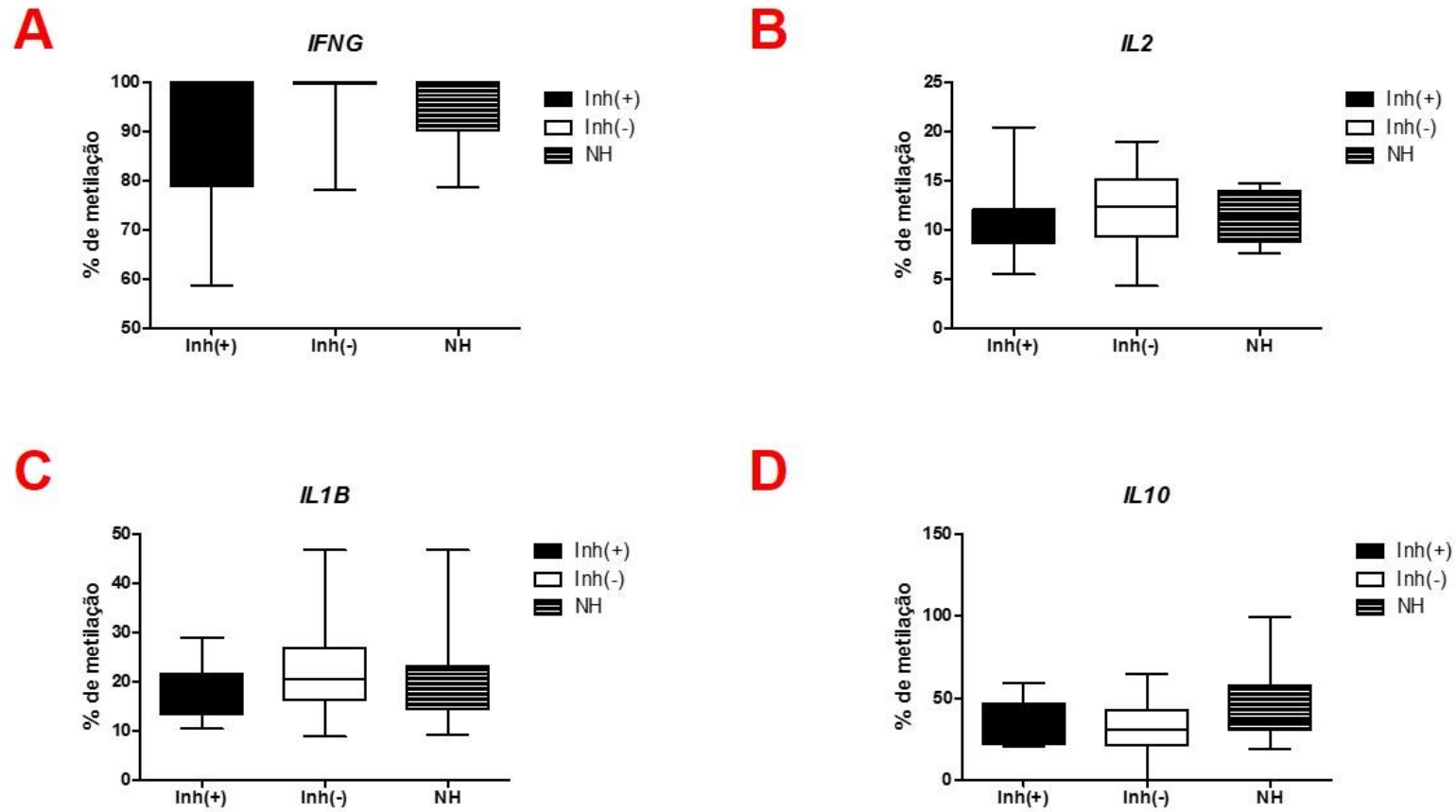
**Figura 9: Porcentagens de metilação para um sítio CpG no gene *TNF* em 10 amostras de homens não relacionados.**

Todos apresentaram estado hipometilado (próximo de 0%).

## **6.2. Avaliação do estado de metilação em hemofílicos inibidores positivo, negativo e não hemofílicos**

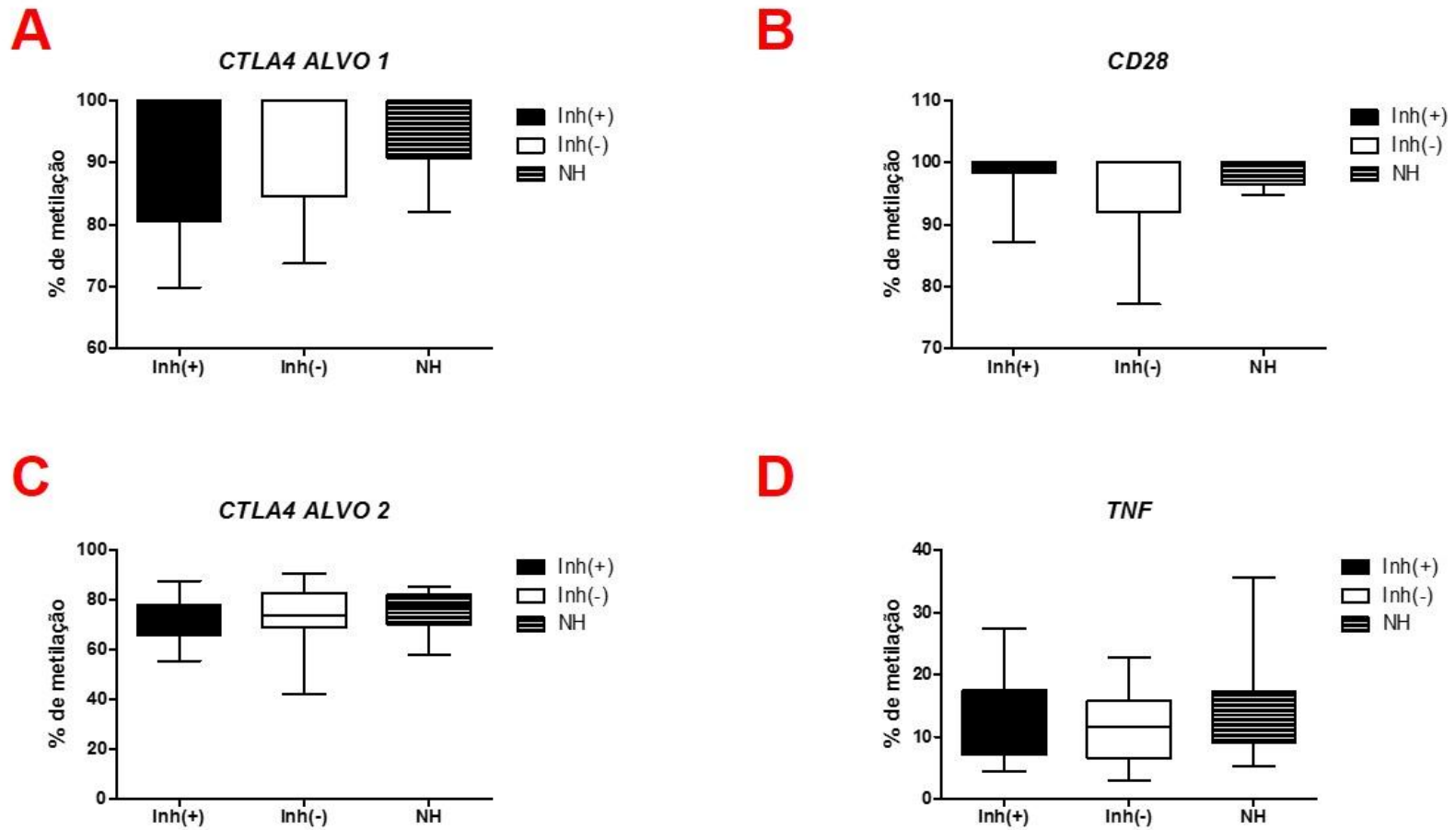
Na avaliação da diferença epigenética no contexto de metilação de DNA entre os indivíduos do grupo caso, controle e indivíduos não hemofílicos. Foram avaliadas as porcentagens de metilação em sítios CpG dos genes *IL1B*, *IL2*, *IL4*, *IL6*, *IL10*, *CST7*, *CTLA4*, *CD28*, *TNF* e *IFNG* em 10 indivíduos do grupo caso, 10 do grupo controle e 10 não hemofílico (figuras 10 e 11). Dos alvos testados, seis (*IFNG*, *CTLA4* alvo 1, *CTLA4* alvo 2, *CD28*, *IL4* alvo 2 e *IL4* alvo 3) apresentaram estado de hipermetilação (próximo à 100%). Outros três (*IL2*, *IL1B* e *TNF*) apresentaram estado de hipometilação (próximo à 0%). Quatro demais alvos (*IL4* alvo 1, *IL10*, *CST7* e *IL6*) apresentaram estado intermediário de metilação (próximo à 50%). Nessa análise inicial foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os grupos: não hemofílicos x Casos nos alvos 1 e 3 do gene *IL4* e *IL6* (dados não mostrados). Também foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre não hemofílicos x Inh(-) no gene *CST7*.





**Figura 10: Análise do perfil de metilação para os genes *IFNG* (A), *IL2* (B), *IL1B* (C) e *IL10* (D) entre os grupos Inh+, Inh- e NH.**

Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ). O alvo *IFNG* apresentou perfil hipermetilado nos grupos. Os alvos *IL2* e *IL1B* apresentaram perfil hipometilado. O alvo *IL10* apresentou perfil de metilação intermediária.



**Figura 11: Análise do perfil de metilação para CTLA4 alvo1 (A), CD28 (B), CTLA4 alvo 2 (C) e TNF (D) entre os grupos Inh+, Inh- e NH.** Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Todos os alvos de CTLA4 apresentaram perfil hipermetilado nos grupos. O alvo *TNF* apresentou perfil hipometilado.

Pela figura 10A notamos o estado hipermetilado do alvo em *IFNG* para todos os grupos avaliados. Esse gene é responsável pela produção da citocina IFN- $\gamma$ , importante mediador em processos inflamatórios. É sabido que em modelos de camundongos hemofílicos o desenvolvimento de inibidores do fator VIII envolve uma ativação dominante de IFN- $\gamma$  (REIPERT *et al.*, 2001). Em humanos, entretanto, há uma maior produção de IFN- $\gamma$  e IL-4 em hemofílicos Inh(+). Tal fenômeno nos permite inferir, que a região promotora nesse gene está mais acessível à fator de transcrição, devendo, portanto, estar mais hipometilada. Não verificamos hipometilação no locus *IFNG* interrogado, o que nos leva a conclusão de que outros sítios não avaliados podem estar influenciando na expressão desse gene. É conhecido que o ponto de metilação avaliado nesse gene apresenta hipermetilação em linfócitos TCD4+ de cordão umbilical em comparativo com células adultas, correlacionando com a expressão. Demais citocinas inflamatórias, *IL2* (figura 10B), *IL1B* (figura 10C) e *TNF* (figura 11D) apresentaram estado hipometilado em todos os grupos. É conhecido que IL2 e TNF são produzidos em menor escala por hemofílicos Inh(+) (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Era esperado um nível de metilação aumentado na região promotora desses genes em Inh(+), o que não foi verificado para os sítios avaliados. Entretanto é possível que outros sítios estejam fazendo a regulação e auxiliando na redução da produção dessas citocinas. É conhecido que a metilação do DNA em outros sítios da região promotora da *IL2* regula sua expressão. Para o gene *TNF*, já é conhecido que células mononucleares de homens obesos sob dieta de restrição calórica apresentam perda de metilação. Também é conhecido que o sítio avaliado no gene *IL1B* apresenta hipometilação sob tratamento com 5-AZA, resultando em aumento de expressão gênica.

Para o sítio no gene *IL10* (figura 10D) foi encontrado estado de metilação intermediário. Os níveis de IL10 estão aumentados no plasma de indivíduos Inh(+) (DING *et al.*, 2014). Mas há divergência de estudos, outro mostrando que os níveis de IL10 são iguais em hemofílicos com ou sem inibidores e indivíduos normais (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Esta é uma importante citocina com função imunomoduladora, apresentando níveis elevados quando alguma resposta imunológica está exacerbada. Em indivíduos Inh(+), cuja resposta Th2 está mais pronunciada (OLIVEIRA *et al.*, 2013), é possível que a

Interleucina 10 atue como imunossupressor nesses indivíduos. O estado de metilação intermediário pode ser condizente com expressão desse locus, mas não foi encontrada diferença de metilação entre os grupos. Outro sítio, bem como outras marcas epigenéticas podem estar regulando o aumento da produção de IL10. Esse gene apresenta seu promotor hipermetilado em linhagens celulares de câncer cervical. Todos os alvos em *CTLA4* apresentaram estado hipermetilado em todos os grupos (Figuras 11<sup>a</sup>, B e C). Este gene é responsável pela sinalização inibitória em linfócitos T ativos, podendo assim estar indiretamente relacionado a diminuição de subpopulações de linfócitos produtores de anticorpos inibidores do FVIII. Não foi encontrada diferença entre os grupos avaliados. Estado hipermetilado do promotor desse gene também é encontrado em linfócitos Treg de pacientes artrite reumatoide. Dados de metilação na literatura para os genes avaliados encontram-se na tabela 6.

**Tabela 6:** Dados de metilação na literatura para os genes alvo

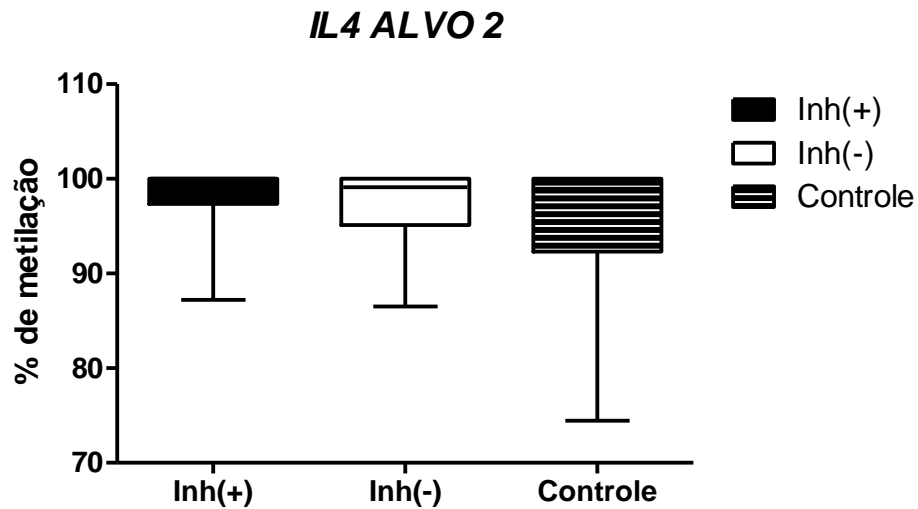
<b>Autor, Data</b>	<b>Gene</b>	<b>Função Biológica</b>	<b>Posição da metilação</b>	<b>Status de metilação</b>	<b>Linhagem Celular</b>	<b>Achado</b>
Campion, Milagro et al. 2009	<i>TNF</i>	Inflamação	Promotor	Hipometilado	PBMC	Homens obesos com perda de peso em uma dieta de restrição calórica têm perda de metilação no promotor do TNF
Cribbs, Kennedy et al. 2014	<i>CTLA4</i>	Sinalização	Promotor	Hipermetilado	Treg	Encontrou metilação do promotor em células Treg de pacientes com artrite reumatoide
White, Watt et al. 2002	<i>IFNG</i>	Inflamação	Promotor	Hipermetilado	Cordão umbilical de recém natos	Hipermetilação de promotores em linfócitos T CD4 + do cordão umbilical em comparação com células adultas, o que está associado a menor expressão de IFNG nesta linhagem celular quando comparada a CD4 + adulta
Hashimoto, Oreffo et al. 2009	<i>IL1B</i>	Inflamação	Promotor	Hipometilado	Condrócitos	Aumento da expressão gênica com a administração de AZA e IL1B. Há redução da metilação do promotor desse gene
Murayama, Sakura et al. 2006	<i>IL2</i>	Proliferação Celular	Promotor	Hipometilado	Células TCD4	Perda de metilação em um único sítio aumenta a expressão
Kwon, Kim et al. 2008	<i>IL4</i>	Inflamação	Promotor	Hipometilado	Células TCD4	Após estimulação antigênica com dermatofagóides metilação diminui em células T CD4 + de pacientes com asma brônquica. A concentração de IL4 mostrou correlação com o nível de metilação
Szalmas, Banati et al. 2008	<i>IL10</i>	Produção de Anticorpos	Promotor	Hipermetilado	Células de câncer cervical	Região promotora hipermetilada em linhagens celulares de câncer cervical
Nile, Read et al. 2008	<i>IL6</i>	Proliferação Celular	Promotor	Hipometilado	PBMC	Alguns pontos estão hipometilados em pacientes com artrite reumatoide. A metilação se correlaciona com a expressão.

### 6.3. Expansão amostral

Foram expandidas as análises para todos os alvos onde foi encontrada diferença estatística significativa, sendo os alvos 1 e 3 do gene *IL4*, *IL6* e *CST7* (dados não mostrados) Também foi expandida análise em alvo que não apresentou diferença entre os grupos (Alvo 2 do gene *IL4*). Esses alvos foram expandidos com base no papel de proliferação de linfócitos B das interleucina *IL4* e *IL6*, e com base no gene *CST7* apresentar evidências de alteração de expressão em pacientes *Inh(+)*. Foram incluídas 10 amostras em cada grupo, totalizando 20 hemofílicos positivo para inibidores, 20 hemofílicos negativo para inibidores e 20 não hemofílicos. Após expansão amostral não foi verificada diferença estatística significativa em nenhum dos grupos avaliados (figuras 12 e 13). Todos os alvos avaliados apresentaram estado de metilação dentro do esperado *in silico*.

*CST7* é o gene para cistatina 7, inibidor de protease com diversas funções na maturação de células da resposta imune. Um estudo brasileiro encontrou expressão aumentada desse gene em hemofílicos *Inh(+)* (SANTOS, 2010a). Dessa forma, era esperada redução da metilação na região promotora desse gene nesse grupo. Entretanto, foi encontrada metilação intermediária nos três grupos. Dessa forma a regulação de sua expressão pode estar acontecendo em outros sítios CpG bem como outras marcas epigenéticas (figura 13D) não há informação na literatura sobre a regulação desse gene por metilação. O gene *IL6* que codifica a IL-6, importante citocina inflamatória. É conhecido que um dos sítios CpG (CpG -1099) em sua região promotora apresenta estado hipometilado em indivíduos com artrite reumatoide (NILE *et al.*, 2008). Todos os grupos apresentaram estado hipermetilado em nossas análises, sem diferença estatística para o sítio interrogado (figura 13C). Para o alvo em *IL6*, também foi possível avaliar também a presença de uma deleção de 2 pares de base, referentes ao SNP rs397766885. Embora a deleção tenha uma frequência menor em hemofílicos inibidores positivo (15%), não foi encontrada diferença significativa entre os três grupos avaliados e a presença de deleção. Não existe literatura relacionando essa deleção à função gênica do *IL6* ou em patologia diversa.

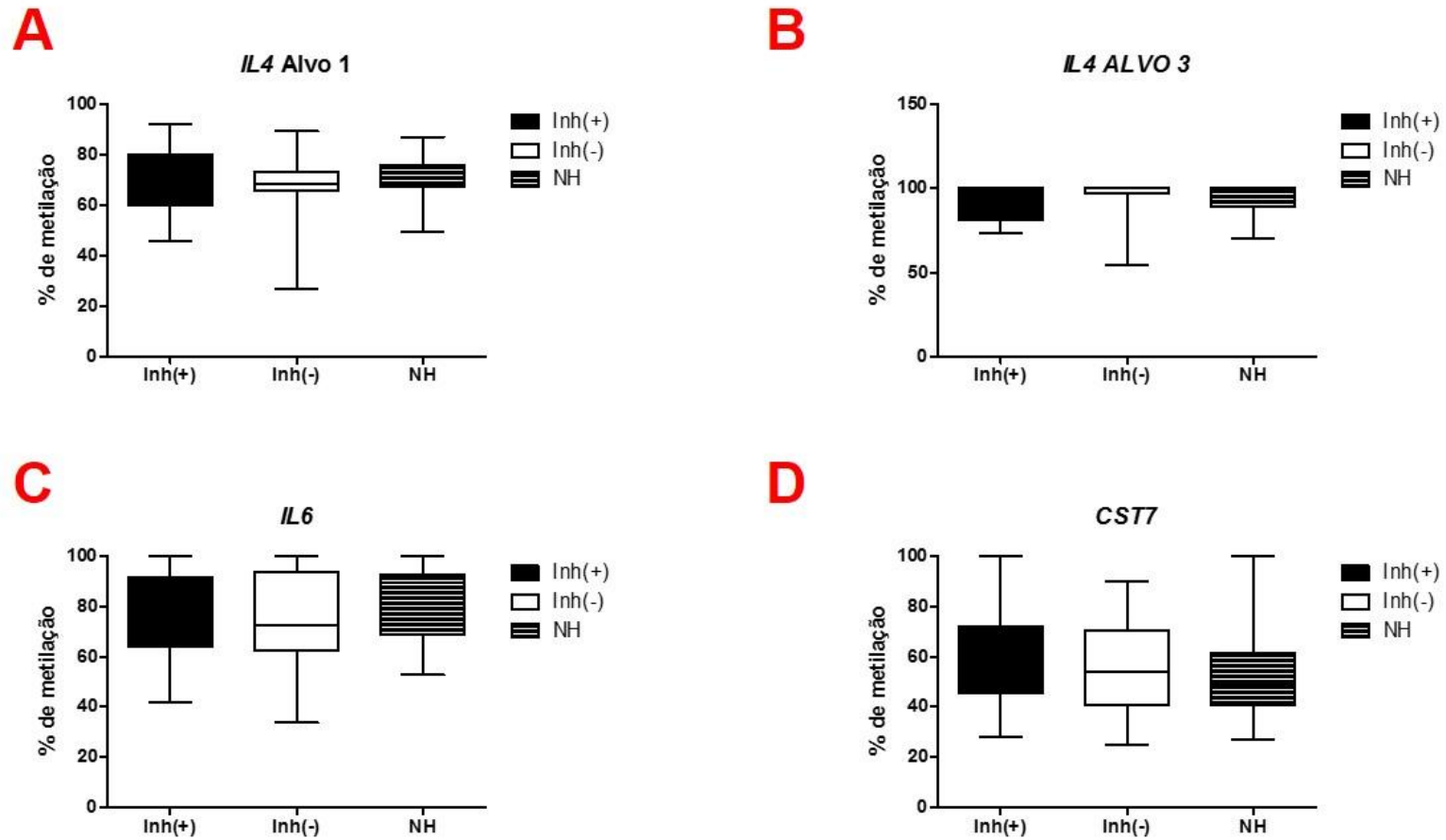
*IL4* é o gene responsável pela produção da IL-4, interleucina com atividade imunomoduladora, sendo considerada uma das principais efetoras na polarização para resposta Th2. Uma vez que anticorpos inibidores são principalmente da subclasse IgG4, a resposta Th2 pode estar mais pronunciada em indivíduos Inh(+) (REDING *et al.*, 2002; CHAVES, D. G. *et al.*, 2010). Foram interrogados três sítios na região promotora desse gene. Todos apresentaram estado hipermetilado, sem diferença entre os grupos. Estudos apresentam divergência quanto à produção de IL-4 em hemofílicos Inh(+). Alguns relatam aumento da produção de IL-4 nesse grupo (HU *et al.*, 2007), enquanto outros não encontraram diferença (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Dessa forma, era esperado hipometilação no grupo Inh(+), o que não foi verificado para os alvos avaliados (figuras 12 e 13A e 13B). O gene *IL4* está situado em uma região regulatória da resposta imune, conhecida como *locus* Th2. Essa região está no cromossomo 5, e apresenta vários genes da resposta imune que se expressam em conjunto, como a *IL4*, *IL5* e *IL13*. É conhecido que essa região apresenta vários sítios para ligação do fator de transcrição GATA3, que estimula o locus a expressar os genes. Também apresenta vários sítios para ligação de T-BET, fator de transcrição que reprime a expressão desse locus (KANHERE *et al.*, 2012). Assim, para avaliar a real correlação entre metilação e produção de IL-4, todos esses pontos devem ser considerados, bem como outras marcas epigenéticas. A figura 14 mostra os valores absolutos de metilação para os alvos expandidos nos três grupos. É possível notar a similaridade dos níveis de metilação encontrados. Dados de metilação desse gene na literatura demonstram após estímulo antigênico por dermatofagóides, a metilação em sua região promotora diminui em linfócitos TCD4+, aumentando sua expressão.



**Figura 12: Distribuição das porcentagens de metilação entre os grupos para um segundo alvo em IL4.**

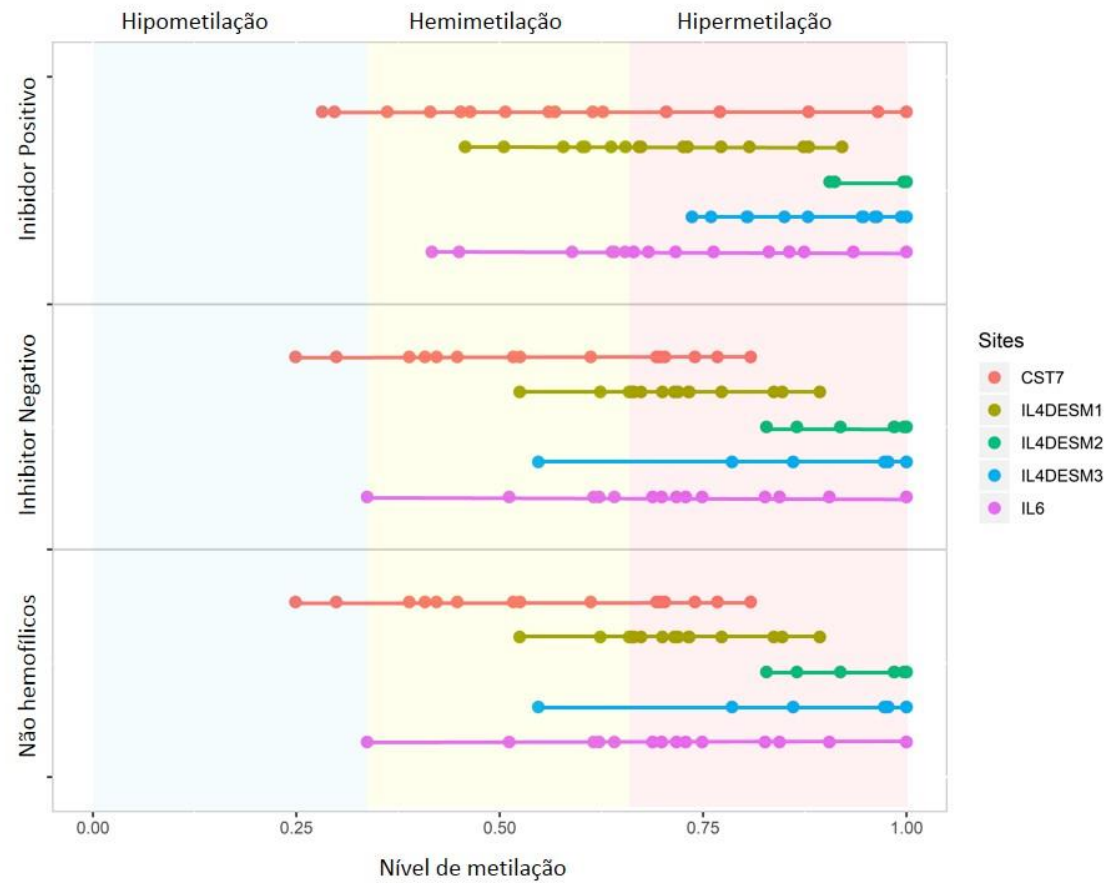
Não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos caso e controle ( $p=0,26$ ), entre o grupo caso e não hemofílico ( $p=0,36$ ) e entre o grupo controle e não hemofílico ( $p=0,85$ ).





**Figura 13: Análise do perfil de metilação para os genes IL4 alvo 1 (A), IL4 alvo 3 (B), IL6 (C) e CST7 (D) entre os grupos Inh+, Inh- e NH.**

Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Todos os alvos em IL4 apresentaram perfil hipermetilado entre os grupos. O alvo *CST7* apresentou metilação intermediária.



**Figura 14: Valores absolutos de metilação dos grupos expandidos.**

Distribuição dos valores de metilação entre os grupos hemofílicos positivos para inibidores [Inh(+)], hemofílicos negativos para inibidores [Inh(-)], e indivíduos não hemofílicos para expansão amostral dos alvos 1, 2 e 3 do gene *IL4*, *CST7* e *IL6*.

## 7. Conclusão

Este é o primeiro trabalho a descrever variações epigenéticas no contexto de metilação do DNA em indivíduos hemofílicos com e sem inibidores. Com base nos dados atuais, não foi encontrada diferença estatística significativa após expansão amostral dos alvos em *IL4*, *CST7* e *IL6* entre os grupos avaliados. Não foi verificada diferença significativa entre os grupos caso e controle. A diferença de resposta imunológica entre os dois grupos, onde indivíduos do grupo caso apresentam resposta imune polarizada para Th2, e indivíduos controle apresentam uma tendência a resposta Th1, pode ser explicada não apenas por metilação de DNA, mas pelo conjunto de marcas epigenéticas existentes em cada indivíduo. Desta maneira, é necessário avaliar o conjunto de marcas epigenéticas em portadores de hemofilia A com e sem inibidores para compreender sua influência nesse fenômeno adverso. Este também é o primeiro trabalho a avaliar a deleção rs397766885 no gene *IL6* em um painel clínico.

## 8. Referências Bibliográficas

AERTS, S. et al. Comprehensive analysis of the base composition around the transcription start site in Metazoa. **BMC Genomics**, v. 5, n. 1, p. 34, Jun 1 2004.

ASTERMARK, J. Why do inhibitors develop? Principles of and factors influencing the risk for inhibitor development in haemophilia. **Haemophilia**, v. 12 Suppl 3, p. 52-60, Jul 2006.

ASTERMARK, J. et al. Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. **Blood**, v. 108, n. 12, p. 3739-45, Dec 1 2006.

ASTERMARK, J. et al. 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, n. 8, p. 3167-72, Apr 15 2006.

ASTERMARK, J. et al. Polymorphisms in the CTLA-4 gene and inhibitor development in patients with severe hemophilia A. **J Thromb Haemost**, v. 5, n. 2, p. 263-5, Feb 2007.

ASTERMARK, J. et al. Polymorphisms in the CTLA-4 gene and inhibitor development in patients with severe hemophilia A. **J Thromb Haemost**, v. 5, n. 2, p. 263-5, Feb 2007.

AUNE, T. M. et al. Epigenetic Activation and Silencing of the Gene that Encodes IFN-gamma. **Front Immunol**, v. 4, p. 112, 2013.

BAFUNNO, V. et al. Polymorphisms in genes involved in autoimmune disease and the risk of FVIII inhibitor development in Italian patients with haemophilia A. **Haemophilia**, v. 16, n. 3, p. 469-73, May 2010.

BALKARANSINGH, P.; YOUNG, G. Novel therapies and current clinical progress in hemophilia A. **Ther Adv Hematol**, v. 9, n. 2, p. 49-61, Feb 2018.

BASSE, A. L. et al. Global gene expression profiling of brown to white adipose tissue transformation in sheep reveals novel transcriptional components linked to adipose remodeling. **BMC Genomics**, v. 16, p. 215, Mar 19 2015.

BESTOR, T. H.; TYCKO, B. Creation of genomic methylation patterns. **Nat Genet**, v. 12, n. 4, p. 363-7, Apr 1996.

BRASIL. **Manual de tratamento das coagulopatias hereditárias**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, DF, p.76. 2006

\_\_\_\_\_. Hemofilia congênita e inibidor: manual de diagnóstico e tratamento de eventos hemorrágicos. **Normas e Manuais Técnicos, Ministério da Saúde**, v. Série A, p. 56, 2009.

\_\_\_\_\_. **Portaria Nº 478, de 16 de Junho de 2014**. SAÚDE, S. D. A. A.: Ministério da Saúde 2014.

\_\_\_\_\_. **Perfil das coagulopatias hereditárias no Brasil**. SAÚDE, S. D. A. À.: Ministério da Saúde. 1 edição 2017.

BRUNIQUEL, D.; SCHWARTZ, R. H. Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. **Nat Immunol**, v. 4, n. 3, p. 235-40, Mar 2003.

BUTCHER, D. T.; RODENHISER, D. I. Epigenetic inactivation of BRCA1 is associated with aberrant expression of CTCF and DNA methyltransferase (DNMT3B) in some sporadic breast tumours. **Eur J Cancer**, v. 43, n. 1, p. 210-9, Jan 2007.

CAMPION, J. et al. TNF-alpha promoter methylation as a predictive biomarker for weight-loss response. **Obesity (Silver Spring)**, v. 17, n. 6, p. 1293-7, Jun 2009.

CARCAO, M.; LAMBERT, T. Prophylaxis in haemophilia with inhibitors: update from international experience. **Haemophilia**, v. 16 Suppl 2, p. 16-23, Mar 2010.

CHAVES, D. et al. Analysis of cytokine genes polymorphism as markers for inhibitor development in haemophilia A. **Int J Immunogenet**, v. 37, n. 2, p. 79-82, Apr 2010.

CHAVES, D. G. et al. A shift towards a T cell cytokine deficiency along with an anti-inflammatory/regulatory microenvironment may enable the synthesis of anti-FVIII inhibitors in haemophilia A patients. **Clin Exp Immunol**, v. 162, n. 3, p. 425-37, Dec 2010.

CORDOVA-PALOMERA, A. et al. Genome-wide methylation study on depression: differential methylation and variable methylation in monozygotic twins. **Transl Psychiatry**, v. 5, p. e557, Apr 28 2015.

CREA, F. Histone code, human growth and cancer. **Oncotarget**, v. 3, n. 1, p. 1-2, Jan 2012.

CRIBBS, A. P. et al. Treg cell function in rheumatoid arthritis is compromised by ctla-4 promoter methylation resulting in a failure to activate the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway. **Arthritis Rheumatol**, v. 66, n. 9, p. 2344-54, Sep 2014.

DE ALENCAR, J. B. et al. New associations: INFG and TGFB1 genes and the inhibitor development in severe haemophilia A. **Haemophilia**, v. 21, n. 4, p. e312-6, Jul 2015.

DIMBERG, J. et al. DNA promoter methylation status and protein expression of interleukin-8 in human colorectal adenocarcinomas. **Int J Colorectal Dis**, v. 27, n. 6, p. 709-14, Jun 2012.

DING, K. Y. et al. Higher frequency of CD4(+)CD25(high) Treg cells in hemophilia patients with factor VIII inhibitor. **Genet Mol Res**, v. 13, n. 1, p. 1774-81, Mar 17 2014.

FANG, H.; WANG, L.; WANG, H. The protein structure and effect of factor VIII. **Thromb Res**, v. 119, n. 1, p. 1-13, 2007.

FITZPATRICK, D. R.; SHIRLEY, K. M.; KELSO, A. Cutting edge: stable epigenetic inheritance of regional IFN-gamma promoter demethylation in CD44<sup>high</sup>CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. **J Immunol**, v. 162, n. 9, p. 5053-7, May 1 1999.

FITZPATRICK, D. R.; WILSON, C. B. Methylation and demethylation in the regulation of genes, cells, and responses in the immune system. **Clin Immunol**, v. 109, n. 1, p. 37-45, Oct 2003.

FRANCHINI, M. 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**, v. 12, n. 4, p. 448-51, Jul 2006.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. Hemostasia e Trombose, 2001, Ribeirão Preto.

FULCHER, C. A. et al. Localization of human factor FVIII inhibitor epitopes to two polypeptide fragments. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n. 22, p. 7728-32, Nov 1985.

GARCIA-GIMENEZ, J. L. et al. Epigenetic biomarkers: A new perspective in laboratory diagnostics. **Clin Chim Acta**, v. 413, n. 19-20, p. 1576-82, Oct 9 2012.

GHOSH, K.; SHETTY, S. Immune response to FVIII in hemophilia A: an overview of risk factors. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 37, n. 2, p. 58-66, Oct 2009.

GITSCHIER, J. et al. Characterization of the human factor VIII gene. **Nature**, v. 312, n. 5992, p. 326-30, Nov 22-28 1984.

GOLBUS, J.; PALELLA, T. D.; RICHARDSON, B. C. Quantitative changes in T cell DNA methylation occur during differentiation and ageing. **Eur J Immunol**, v. 20, n. 8, p. 1869-72, Aug 1990.

GOWERS, I. R. et al. Age-related loss of CpG methylation in the tumour necrosis factor promoter. **Cytokine**, v. 56, n. 3, p. 792-7, Dec 2011.

GRAW, J. et al. Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. **Nat Rev Genet**, v. 6, n. 6, p. 488-501, Jun 2005.

HANDY, D. E.; CASTRO, R.; LOSCALZO, J. Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease. **Circulation**, v. 123, n. 19, p. 2145-56, May 17 2011.

HASHIMOTO, K. et al. DNA demethylation at specific CpG sites in the IL1B promoter in response to inflammatory cytokines in human articular chondrocytes. **Arthritis Rheum**, v. 60, n. 11, p. 3303-13, Nov 2009.

HAY, C. R. Factor VIII inhibitors in mild and moderate-severity haemophilia A. **Haemophilia**, v. 4, n. 4, p. 558-63, Jul 1998.

HAY, C. R. et al. Factor VIII inhibitors in mild and moderate-severity haemophilia A. UK Haemophilia Centre Directors Organisation. **Thromb Haemost**, v. 79, n. 4, p. 762-6, Apr 1998.

HAY, C. R. et al. Incidence of factor VIII inhibitors throughout life in severe hemophilia A in the United Kingdom. **Blood**, v. 117, n. 23, p. 6367-70, Jun 9 2011.

HERMSDORFF, H. H. et al. TNF-alpha promoter methylation in peripheral white blood cells: relationship with circulating TNFalpha, truncal fat and n-6 PUFA intake in young women. **Cytokine**, v. 64, n. 1, p. 265-71, Oct 2013.



HU, G. et al. Cytokine production by CD4+ T cells specific for coagulation factor VIII in healthy subjects and haemophilia A patients. **Thromb Haemost**, v. 97, n. 5, p. 788-94, May 2007.

HU, G. L. et al. Recognition of coagulation factor VIII by CD4+ T cells of healthy humans. **J Thromb Haemost**, v. 1, n. 10, p. 2159-66, Oct 2003.

HUANG, Y. et al. Developing a DNA methylation assay for human age prediction in blood and bloodstain. **Forensic Sci Int Genet**, v. 17, p. 129-136, Jul 2015.

HWANG, S. H. et al. Profiling of differentially expressed genes in haemophilia A with inhibitor. **Haemophilia**, v. 18, n. 3, p. e247-53, May 2012.

INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING, C. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. **Nature**, v. 431, n. 7011, p. 931-45, Oct 21 2004.

JIRTLE, R. L.; SKINNER, M. K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nat Rev Genet**, v. 8, n. 4, p. 253-62, Apr 2007.

JOHNSON, M. D. et al. Genetic analysis of the cardiac methylome at single nucleotide resolution in a model of human cardiovascular disease. **PLoS Genet**, v. 10, n. 12, p. e1004813, Dec 2014.

KANHERE, A. et al. T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements. **Nat Commun**, v. 3, p. 1268, 2012.

KASPER, C. K. et al. Proceedings: A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. **Thromb Diath Haemorrh**, v. 34, n. 2, p. 612, Nov 15 1975.

KEY, N. S. Inhibitors in congenital coagulation disorders. **Br J Haematol**, v. 127, n. 4, p. 379-91, Nov 2004.

KRIAUCIONIS, S.; HEINTZ, N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. **Science**, v. 324, n. 5929, p. 929-30, May 15 2009.

KRIAUCIONIS, S.; TAHILIANI, M. Expanding the epigenetic landscape: novel modifications of cytosine in genomic DNA. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 6, n. 10, p. a018630, Oct 1 2014.

KWON, N. H. et al. DNA methylation and the expression of IL-4 and IFN-gamma promoter genes in patients with bronchial asthma. **J Clin Immunol**, v. 28, n. 2, p. 139-46, Mar 2008.

LEE, C. A.; BERNTORP, E.; HOOTS, K. **Textbook of hemophilia**. Second. Singapore: Wiley-Blackwell, 2010. 482.

LEE, D. U.; AGARWAL, S.; RAO, A. Th2 lineage commitment and efficient IL-4 production involves extended demethylation of the IL-4 gene. **Immunity**, v. 16, n. 5, p. 649-60, May 2002.

LEI, T. C.; SCOTT, D. W. Induction of tolerance to factor VIII inhibitors by gene therapy with immunodominant A2 and C2 domains presented by B cells as Ig fusion proteins. **Blood**, v. 105, n. 12, p. 4865-70, Jun 15 2005.

LEIRIA, L. B. et al. Introns 1 and 22 inversions and factor VIII inhibitors in patients with severe haemophilia A in southern Brazil. **Haemophilia**, v. 15, n. 1, p. 309-13, Jan 2009.

LIU, C. L. et al. In vivo expansion of regulatory T cells with IL-2/IL-2 mAb complexes prevents anti-factor VIII immune responses in hemophilia A mice treated with factor VIII plasmid-mediated gene therapy. **Mol Ther**, v. 19, n. 8, p. 1511-20, Aug 2011.

LOZIER, J. N. et al. A case-control study reveals immunoregulatory gene haplotypes that influence inhibitor risk in severe haemophilia A. **Haemophilia**, v. 17, n. 4, p. 641-9, Jul 2011.

LUKK, M. et al. A global map of human gene expression. **Nat Biotechnol**, v. 28, n. 4, p. 322-4, Apr 2010.

MACHADO, F. B.; MEDINA-ACOSTA, E. High-resolution combined linkage physical map of short tandem repeat loci on human chromosome band Xq28 for indirect haemophilia A carrier detection. **Haemophilia**, v. 15, n. 1, p. 297-308, Jan 2009.

MARGAGLIONE, M. et al. The Italian AICE-Genetics hemophilia A database: results and correlation with clinical phenotype. **Haematologica**, v. 93, n. 5, p. 722-8, May 2008.

MARGAGLIONE, M. et al. The Italian AICE-Genetics hemophilia A database: results and correlation with clinical phenotype. **Haematologica**, v. 93, n. 5, p. 722-8, May 2008.

MARGUERON, R.; REINBERG, D. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. **Nat Rev Genet**, v. 11, n. 4, p. 285-96, Apr 2010.

MI, X. B.; ZENG, F. Q. Hypomethylation of interleukin-4 and -6 promoters in T cells from systemic lupus erythematosus patients. **Acta Pharmacol Sin**, v. 29, n. 1, p. 105-12, Jan 2008.

MIKOVITS, J. A. et al. Infection with human immunodeficiency virus type 1 upregulates DNA methyltransferase, resulting in de novo methylation of the gamma interferon (IFN-gamma) promoter and subsequent downregulation of IFN-gamma production. **Mol Cell Biol**, v. 18, n. 9, p. 5166-77, Sep 1998.

MOGHIMI, B. et al. Induction of tolerance to factor VIII by transient co-administration with rapamycin. **J Thromb Haemost**, v. 9, n. 8, p. 1524-33, Aug 2011.

MOLINOS QUINTANA, A. et al. [Familial transmission of community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection]. **An Pediatr (Barc)**, v. 69, n. 6, p. 580-1, Dec 2008.

MURAYAMA, A. et al. A specific CpG site demethylation in the human interleukin 2 gene promoter is an epigenetic memory. **EMBO J**, v. 25, n. 5, p. 1081-92, Mar 8 2006.

NILE, C. J. et al. Methylation status of a single CpG site in the IL6 promoter is related to IL6 messenger RNA levels and rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 58, n. 9, p. 2686-93, Sep 2008.

OLIVEIRA, C. A. et al. Cytokine profile and FVIII inhibitors development in haemophilia A. **Haemophilia**, v. 19, n. 3, p. e139-42, May 2013.

PAVLOVA, A. et al. Increased frequency of the CTLA-4 49 A/G polymorphism in patients with acquired haemophilia A compared to healthy controls. **Haemophilia**, v. 14, n. 2, p. 355-60, Mar 2008.

QUDDUS, J. et al. Treating activated CD4+ T cells with either of two distinct DNA methyltransferase inhibitors, 5-azacytidine or procainamide, is sufficient to cause a lupus-like disease in syngeneic mice. **J Clin Invest**, v. 92, n. 1, p. 38-53, Jul 1993.

RAGNI, M. V. et al. Risk factors for inhibitor formation in haemophilia: a prevalent case-control study. **Haemophilia**, v. 15, n. 5, p. 1074-82, Sep 2009.

REDING, M. T. et al. Distribution of Th1- and Th2-induced anti-factor VIII IgG subclasses in congenital and acquired hemophilia patients. **Thromb Haemost**, v. 88, n. 4, p. 568-75, Oct 2002.

REDING, M. T. et al. Human CD4+ T-cell epitope repertoire on the C2 domain of coagulation factor VIII. **J Thromb Haemost**, v. 1, n. 8, p. 1777-84, Aug 2003.

REINIUS, L. E. et al. Differential DNA methylation in purified human blood cells: implications for cell lineage and studies on disease susceptibility. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41361, 2012.

REIPERT, B. M. et al. Blockade of CD40/CD40 ligand interactions prevents induction of factor VIII inhibitors in hemophilic mice but does not induce lasting immune tolerance. **Thromb Haemost**, v. 86, n. 6, p. 1345-52, Dec 2001.

REPESSE, Y. et al. Development of inhibitory antibodies to therapeutic factor VIII in severe hemophilia A is associated with microsatellite polymorphisms in the HMOX1 promoter. **Haematologica**, v. 98, n. 10, p. 1650-5, Oct 2013.

REPESSE, Y. 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**, v. 5, n. 7, p. 1469-76, Jul 2007.

RIVIERE, I.; SUNSHINE, M. J.; LITTMAN, D. R. Regulation of IL-4 expression by activation of individual alleles. **Immunity**, v. 9, n. 2, p. 217-28, Aug 1998.

RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **CMAJ**, v. 174, n. 3, p. 341-8, Jan 31 2006.

SANTANGELO, S. et al. Chromatin structure and DNA methylation of the IL-4 gene in human T(H)2 cells. **Chromosome Res**, v. 17, n. 4, p. 485-96, 2009.

SANTANGELO, S. et al. DNA methylation changes at human Th2 cytokine genes coincide with DNase I hypersensitive site formation during CD4(+) T cell differentiation. **J Immunol**, v. 169, n. 4, p. 1893-903, Aug 15 2002.

SANTOS, A. **Caracterização de aspectos genéticos e imunológicos envolvidos no desenvolvimento de inibidores em hemofilia A e B.** 2010a. 156 Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas.

\_\_\_\_\_. **Caracterização de aspectos genéticos e imunológicos envolvidos no desenvolvimento de inibidores em Hemofilia A e B.** 2010b. 156 Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

SARKAR, D. et al. Ex Vivo Expanded Autologous Polyclonal Regulatory T Cells Suppress Inhibitor Formation in Hemophilia. **Mol Ther Methods Clin Dev**, v. 1, Jul 30 2014.

SCHOENBORN, J. R. et al. Comprehensive epigenetic profiling identifies multiple distal regulatory elements directing transcription of the gene encoding interferon-gamma. **Nat Immunol**, v. 8, n. 7, p. 732-42, Jul 2007.

SCHWAAB, R. et al. Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. **Thromb Haemost**, v. 74, n. 6, p. 1402-6, Dec 1995.

SCOTT, D. W. Inhibitors - cellular aspects and novel approaches for tolerance. **Haemophilia**, v. 20 Suppl 4, p. 80-6, May 2014.

SHEN, B. W. et al. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1240-7, Feb 1 2008.

SHERMAN, A.; BISWAS, M.; HERZOG, R. W. Innovative Approaches for Immune Tolerance to Factor VIII in the Treatment of Hemophilia A. **Front Immunol**, v. 8, p. 1604, 2017.

SLAGBOOM, P. E.; DE LEEUW, W. J.; VIJG, J. Messenger RNA levels and methylation patterns of GAPDH and beta-actin genes in rat liver, spleen and brain in relation to aging. **Mech Ageing Dev**, v. 53, n. 3, p. 243-57, Apr 30 1990.

STIRZAKER, C. et al. Methylome sequencing in triple-negative breast cancer reveals distinct methylation clusters with prognostic value. **Nat Commun**, v. 6, p. 5899, Feb 2 2015.

SZALMAS, A. et al. Lineage-specific silencing of human IL-10 gene expression by promoter methylation in cervical cancer cells. **Eur J Cancer**, v. 44, n. 7, p. 1030-8, May 2008.

TAMARU, H. Confining euchromatin/heterochromatin territory: jumonji crosses the line. **Genes Dev**, v. 24, n. 14, p. 1465-78, Jul 15 2010.

ULAHANNAN, N.; GREALLY, J. M. Genome-wide assays that identify and quantify modified cytosines in human disease studies. **Epigenetics Chromatin**, v. 8, p. 5, 2015.

VAN VALEN, L. A new evolutionary law. **Evolutionary Theory**, v. 1, p. 30, 1973.

VERBRUGGEN, B. et al. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. **Thromb Haemost**, v. 73, n. 2, p. 247-51, Feb 1995.

VIEL, K. R. et al. Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia. **N Engl J Med**, v. 360, n. 16, p. 1618-27, Apr 16 2009.

VIEL, K. R. et al. A sequence variation scan of the coagulation factor VIII (FVIII) structural gene and associations with plasma FVIII activity levels. **Blood**, v. 109, n. 9, p. 3713-24, May 1 2007.

WARD, S. B. et al. Chromatin remodeling of the interleukin-2 gene: distinct alterations in the proximal versus distal enhancer regions. **Nucleic Acids Res**, v. 26, n. 12, p. 2923-34, Jun 15 1998.

WHITAKER, J. W. et al. An imprinted rheumatoid arthritis methylome signature reflects pathogenic phenotype. **Genome Med**, v. 5, n. 4, p. 40, 2013.

WHITE, G. P. et al. Differential patterns of methylation of the IFN-gamma promoter at CpG and non-CpG sites underlie differences in IFN-gamma gene expression between human neonatal and adult CD45RO- T cells. **J Immunol**, v. 168, n. 6, p. 2820-7, Mar 15 2002.

WILSON, V. L.; JONES, P. A. DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. **Science**, v. 220, n. 4601, p. 1055-7, Jun 3 1983.

WILSON, V. L. et al. Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. **J Biol Chem**, v. 262, n. 21, p. 9948-51, Jul 25 1987.

WITMER, C.; YOUNG, G. Factor VIII inhibitors in hemophilia A: rationale and latest evidence. **Ther Adv Hematol**, v. 4, n. 1, p. 59-72, Feb 2013.

WU, H. et al. Mechanism of the immune response to human factor VIII in murine hemophilia A. **Thromb Haemost**, v. 85, n. 1, p. 125-33, Jan 2001.

ZHANG, A. H. et al. Tolerogenic nanoparticles to induce immunologic tolerance: Prevention and reversal of FVIII inhibitor formation. **Cell Immunol**, v. 301, p. 74-81, Mar 2016.

ZHANG, A. H.; SKUPSKY, J.; SCOTT, D. W. Factor VIII inhibitors: risk factors and methods for prevention and immune modulation. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 37, n. 2, p. 114-24, Oct 2009.