

**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA DEFICIÊNCIA HEREDITÁRIA DE FATOR
VIII EM PACIENTES HEMOFÍLICOS DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

por

Simone Ferreira Pio

**Belo Horizonte
Dezembro/2010**

TESE DBCM-CPqRR S. F. PIO 2010

**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA DEFICIÊNCIA HEREDITÁRIA DE FATOR
VIII EM PACIENTES HEMOFÍLICOS DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

por

Simone Ferreira Pio

**Tese apresentada com vistas à
obtenção do título de Doutor em
Ciências na área de concentração de
Biologia Celular e Molecular.**

**Orientação:
Dr. Guilherme Corrêa Oliveira**

**Co-orientação:
Dra. Suely Meireles Rezende**

**Belo Horizonte
Dezembro/2010**

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

P662c
2010

Pio, Simone Ferreira.

Caracterização Molecular da Deficiência de Fator VIII em Pacientes Hemofílicos de Minas Gerais / Simone Ferreira Pio. – Belo Horizonte, 2010.

XIX, 134 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 134 - 153

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Hemofilia A/genética 2. Fator VIII/genética 3. Íntrons/genética I. Título. II. Oliveira, Guilherme Corrêa (Orientação). III. Rezende, Suely Meireles (Co-Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.157 2

**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA DEFICIÊNCIA HEREDITÁRIA DE FATOR
VIII EM PACIENTES HEMOFÍLICOS DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

por

Simone Ferreira Pio

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dra. Suely Meireles Rezende (Presidente)

Prof. Dra. Maria das Graças Carvalho

Prof. Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes

Prof. Dr. Edward José de Oliveira

Prof. Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito

Suplente: Prof. Dra. Cristiane Lafetá Gomes Furtado de Mendonça

Tese defendida e aprovada em: 17/12/2010

Senão houver frutos,
valeu a beleza das flores
Senão houver flores,
valeu a sombra das folhas
E, senão houver folhas,
valeu a intenção da semente

Maurício Francisco Cedin
Citada por Henfil no livro
"Diretas Já"

DEDICATÓRIA

Àqueles que foram o propósito e o instrumento deste trabalho: participantes e seus familiares.

AGRADECIMENTOS

Acredito que todo trabalho é fruto de uma combinação de empenho e dedicação de várias pessoas em prol de um objetivo comum, assim agradeço a todas as pessoas com as quais convivi, partilhei e aprendi ao longo desta caminhada e que certamente fazem parte desta história!

Agradeço ainda:

A agência financiadora deste projeto:

Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais;

A todas as instituições que me acolheram para a realização deste trabalho e a seus funcionários:

Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais;

Ao Centro de Pós-Graduação da Santa Casa de Misericórdia de BH;

Ao Centro de Pesquisa René Rachou;

Ao Hemocentro de Hematologia e Hemoterapia da UNICAMP;

À Faculdade de Medicina da UFMG.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

Aos orientadores que estiveram na condução deste projeto:

Dra. Suelly Meirles Rezende;

Dr. Guilherme Corrêa de Oliveira.

Aos membros da banca pela disponibilidade de participar deste trabalho

Prof. Dra. Maria das Graças Carvalho;

Prof. Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes

Prof. Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito

Prof. Dr. Edward José de Oliveira

Prof. Dra. Cristiane Lafetá Gomes Furtado de Mendonça

Aos pacientes participantes deste projeto, bem como, aos seus familiares pela preciosa colaboração

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XIV
RESUMO.....	XVIII
ABSTRACT.....	XIX
1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 A coagulação na Idade Antiga.....	20
1.2 A coagulação na Idade Moderna.....	20
1.3 A coagulação na Idade Contemporânea.....	21
1.3.1 O modelo da cascata da coagulação.....	22
1.3.2 O novo modelo da coagulação.....	25
1.4 A hemostasia.....	26
1.4.1 A hemostasia primária.....	27
1.4.2 A hemostasia secundária.....	29
1.4.3 A hemostasia terciária ou fibrinólise.....	32
1.4.4 A regulação da hemostasia.....	33
1.5 Doenças do sistema hemostático.....	34
1.6 As hemofilias na perspectiva histórica.....	34
1.7 As hemofilias na perspectiva atual.....	36
1.7.1 A hemofilia A.....	36
1.7.1.1 Conceito etiologia e epidemiologia.....	36
1.7.1.2 Diagnóstico laboratorial da Hemofilia A.....	37
1.7.1.3 Manifestações clínicas da hemofilia A.....	38
1.7.1.4 Tratamento da hemofilia A.....	39
1.7.1.5 Complicações do tratamento.....	40
1.7.1.5.1 Acesso venoso.....	40
1.7.1.5.2 Infecções virais.....	40
1.7.1.5.3 Desenvolvimento de inibidores.....	41
1.7.1.6 Aspectos genéticos da hemofilia A.....	45
1.7.1.7 Aspectos moleculares da hemofilia A.....	48
1.7.1.7.1 O gene do FVIII.....	48
1.7.1.7.2 O transcrito do gene do FVIII - RNA mensageiro.....	53
1.7.1.7.3 A proteína FVIII.....	53

1.7.1.7.4 O papel fisiológico do FVIII.....	56
1.7.1.8 As bases moleculares da hemofilia A.....	56
1.7.1.8.1 Inversão do íntron 22.....	58
1.7.1.8.2 Inversão do íntron 1.....	60
1.7.1.8.3 Outras interações genéticas.....	61
1.7.1.9 Implicações do diagnóstico molecular das hemofilias.....	63
2 OBJETIVOS.....	65
2.1 Objetivo Geral.....	65
2.2 Objetivos Específicos.....	65
3 METODOLOGIA.....	66
3.1 Delineamento experimental.....	66
3.2 Elaboração do projeto.....	67
3.3 Submissão aos Comitês de Ética.....	67
3.4 Levantamento de prontuários e seleção de pacientes.....	67
3.5 Convite aos possíveis participantes da pesquisa.....	68
3.6 Formação do grupo de participantes.....	68
3.7 Coleta de amostra biológica.....	69
3.8 Extração de DNA.....	69
3.9 Análise da inversão do íntron 1.....	70
3.10 Análise da inversão do íntron 22.....	72
3.11 Análise das demais mutações.....	74
3.11.1 Amplificação da região codificadora de <i>F8</i>	74
3.11.2 Purificação dos produtos amplificados.....	77
3.11.3 Reações de Sequenciamento.....	78
3.11.4 Análises das sequências.....	78
3.12 Levantamento de prontuários médicos.....	79
3.12.1 Coleta de dados sobre inibidores.....	79
3.12.2 Coleta de dados do perfil sorológico.....	79
3.13 Análise estatística.....	80
4 RESULTADOS.....	81
4.1 Pio SF, Oliveira GC, Rezende SM. The molecular bases of hemophilia A. Rev Assoc Med Bras. 2009 Mar-Apr;55(2):213-9.....	81
4.2 Pio SF, Mühle C, Oliveira GC Rezende SM. Detection of int1h-related inversion of the factor VIII gene. Haemophilia. 2011 Mar;17(2):313-4.....	88
4.3 Pio SF, Oliveira GC, Soares S, Rezende SM. An aberrant pattern for	

intron 1 inversion of factor VIII gene. Haemophilia. 2011 doi: 10.1111/j.1365-2516.2010.02482.x. [Epub ahead of print].....	90
4.4 Pio SF, Ozelo MC, Santos A, Zouain D, Oliveira GC, Rezende SM. The long-term course of factor VIII inhibitors in patients with congenital severe hemophilia A and its relation to genotype (Em redação).....	92
4.5 Resultados adicionais : Mühle C, Pio SF, Soares S, Oliveira GC, Rezende SM. Molecular characterization of an aberrant intron 1 inversion pattern in the factor VIII gene in a patient with severe hemophilia A. (Em redação).....	109
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	124
6 ANEXOS.....	125
6.1 Recomendação do sub comitê científico em fator VIII e IX do Comitê científico e padronização da “International Society on Thrombosis and Haemostasis”.....	125
6.2 Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas.....	126
6.3 Parecer do Comitê de Ética do Centro de Pesquisa René Rachou.....	127
6.4 Carta-convite aos possíveis participantes da pesquisa.....	128
6.5 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	129
6.6 Ficha de Avaliação Clínica.....	130
6.7 Ficha de Coleta de dados.....	133
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	134

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da teoria clássica da coagulação proposta por Paul Morawitz em 1905.....	22
Figura 2	Representação esquemática do modelo da cascata da coagulação.....	23
Figura 3	Representação esquemática dos sistemas hemostáticos que contribuem para o equilíbrio da hemostasia.....	26
Figura 4	Representação esquemática das funções metabólicas e de síntese da célula endotelial.....	27
Figura 5	Representação esquemática dos principais eventos da hemostasia primária.....	30
Figura 6	Representação esquemática do modelo celular da coagulação, mostrando as fases da iniciação, amplificação e propagação.....	30
Figura 7	Representação esquemática da degradação da fibrina pelo sistema fibrinolítico.....	32
Figura 8	Representação do padrão de herança da hemofilia.....	46
Figura 9	Representação esquemática do mosaicismos germinativo em hemofilia. A.	47
Figura 10	Representação esquemática do mosaicismos somático em hemofilia.....	48
Figura 11	Representação esquemática da organização estrutural de <i>F8</i> e <i>FVIII</i>	50
Figura 12	Representação esquemática da região promotora do gene do <i>FVIII</i>	51
Figura 13	Representação esquemática da região do íntron 22 do gene do <i>FVIII</i>	52
Figura 14	Representação esquemática das inversões dos íntrons 1 e 22 de <i>F8</i>	59
Figura 15	Estruturação esquemática da metodologia desenvolvida no trabalho.....	66
Figura 16	Representação esquemática das unidades de atendimento da Fundação HEMOMINAS.....	68

Figura 17	Representação esquemática da análise da inversão do Íntron1 de <i>F8</i>	71
Figura 18	Representação esquemática das etapas usadas para a análise da inversão do íntron 22.....	73
Figura 19	Parâmetros de qualidade estabelecidos pelo programa <i>Sequencer scanner</i>	79

LISTA DE TABELAS




Tabela 1	Proteínas envolvidas no processo da hemostasia com respectivas localizações cromossômicas, local de expressão, localização e função.....	24
Tabela 2	Fatores de riscos genéticos e ambientais que contribuem para a formação de inibidores.....	44
Tabela 3	Tamanho dos éxons e íntrons do gene do FVIII.....	48
Tabela 4	Resumo das alterações genéticas compiladas em bancos de dados.....	57
Tabela 5	Estudos representativos da inversão do íntron 1 e íntron 22 em casos de hemofilia A grave.....	60
Tabela 6	Descrição dos oligonucleotídeos e padrões de amplificação para a análise da inversão do íntron 1 de <i>F8</i>	71
Tabela 7	Oligonucleotídeos e padrões de amplificação para a análise da inversão do íntron 22 de <i>F8</i>	72
Tabela 8	Oligonucleotídeos usados na amplificação dos éxons de <i>F8</i> e seus respectivos tamanhos sem/com caudas N13.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

a	ativado
a.C.	antes de Cristo
ADP	Di fosfato de adenosina
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Anti HBc	Anticorpo para o nucleocapsídeo do vírus da hepatite B
Anti-HBS	Anticorpo para o antígeno de superfície do vírus da hepatite B
anti-HCV	Anticorpo para o Vírus da hepatite C
Anti-HCV _C	anticorpo para o vírus da hepatite C confirmatório
AT-III	Antitrombina
ATP	Tri fosfato de adenosina
BIP	Proteína de ligação a imunoglobulina
BRCC3	BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 3
°C	Graus Centígrados
C	Calicreína
c.	Referência a uma data aproximada, do latim circa
Ca ⁺⁺	Íon cálcio
CAMP	Cininogênio de Alto Peso Molecular
C/EBP β	Proteína Estimuladora de ligação Alfa e Beta
CPPA	Complexo protrombínico parcialmente ativado
CTLA-4	Antígeno 4 de linfócito T citotóxico
Cys	Cisteína
DDAVP	1-deamino-8-D-arginina vasopressina
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTP's	Desoxinucleotídeo(s)
DvW	Doença de Von Willebrand
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPCR	Receptor de proteína C endotelial
FAPEMIG	Fundação d Amparo à pesquisa de Minas Gerais
F8	Gene do Fator VIII
FV	Fator V
FVII	Fator VII

FVIII	Fator VIII
FVIII:C	Atividade coagulante do Fator VIII
FIX	Fator IX
FX	Fator X
FXI	Fator XI
FXII	Fator XII
FXIII	Fator XIII
FVII/FT	Complexo fator VII/Fator tecidual
FT	Fator tecidual
FvW	Fator de Von Willebrand
FL	Fosfolípidos
GP	Glicoproteína
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glycina
HADB	Hemophilia A Mutation Data Base and Factor VIII resource Site
HBS Ag	Antígeno de superfície do vírus da Hepatite B
HEMOMINAS	Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais
HGMD	The human Mutation Data Base.
HIC	Hemorragia intra craniana
His	Histidina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HNF-1	Fator 1 nuclear do hepatócito
HNF4	Fator 4 nuclear do hepatócito
HTLVI	Vírus linfotrópicos de Células T humana tipo I
HTLVII	Vírus linfotrópicos de Células T humana tipo II
IL10	Interleucina 10
I-PCR	PCR inverso
IPZ	Inibidor de protease dependente de proteína
ISTH	“International Society on Thrombosis and Haemostasis”
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de potássio
KDa	kiloDalton
K3EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético tripotássio

<i>LMAN1</i>	“lectin, manose binding 1”
M	Molar
mM	Milimolar
Me ⁺⁺	Metal bivalente
<i>MCFD2</i>	“Multiple coagulation factor deficiency 2 protein”
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MHCII	Complexo principal de Histocompatibilidade de classe II
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
NF κ B	Fator nuclear Kappa B
ng	Nanogramas
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogenio 1
PAI-2	Inibidor do ativador do plasminogênio 2
PAR-1	Receptor ativador de protease - 1
pb	Par de base
pC	Pré-caliceína
PC	Proteína C
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
PDF	Produto de degradação da Fibrina
PDGF	Fator de Crescimento derivado de plaqueta
pFVIII	Concentrado de FVIII derivado de plasma
Plg	Plasminogênio
Pln	Plasmina
pmol	Picomole(s)
PS	Proteína S
PZ	Proteína Z
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism”
rFVIIa	Fator VII recombinante ativado
rFVIII	Fator VIII recombinante
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNPs	Polimorfismo de base única

TAFI	Inibidor fibrinolítico ativado por trombina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TFPI	Inibidor da via do fator tecidual
TIT	Tratamento de imunotolerância
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TP	Tempo de protrombina
t-PA	Ativador de plasminogênio tecidual
Tris-HCl	Tris Hidrocloreto
Trp	Triptofano
TTPA	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
Tyr	Tirosina
TXA2	Tromboxano A2
U/mL	Unidade(s) por mililitro
UI/mL	Unidade(s) internacional(is) por mililitro
UB	Unidade(s) Betesda
UB/ml	Unidades Betesda por mililitro
UKHCDO	“United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation”
u-PA	Ativador de plasminogênio uroquinase
<i>VBP1</i>	von Hippel-Lindau binding protein 1
VNTRs	sequências de número variável de repetições em tandem
WFH	Federação Mundial de Hemofilia
α_2 -AP	Alfa 2 antiplasmina
α_2 -MG	Alfa 2 macroglobulina
	Micrograma(s)
	Micromolar
	Microlitro(s)

Resumo

Hemofilia A, uma doença hemorrágica ligada ao cromossomo X, é causada pela deficiência ou disfunção do fator VIII da coagulação (FVIII). A doença resulta de alterações genéticas no gene do fator VIII (*F8*). Clinicamente, a hemofilia A é caracterizada por hemorragias em diferentes partes do corpo e o tratamento recomendado é a reposição do fator FVIII deficiente. O desenvolvimento de anticorpos inibidores para o FVIII é a principal complicação do tratamento. Estes anticorpos neutralizam a atividade do FVIII e, portanto invalidam a terapia. Os riscos para o desenvolvimento destes anticorpos são multifatoriais e envolvem fatores genéticos e ambientais. O objetivo deste estudo foi determinar as bases moleculares da hemofilia A grave e sua correlação com o desenvolvimento de inibidores em associação com o perfil sorológico par doenças virais. As análises moleculares consistiram da determinação da inversão do íntron 1 e do íntron 22 (inv1 e inv 22), além da determinação de outras alterações genéticas presentes na região codificadora de *F8*. Inicialmente, 150 pacientes, com hemofilia A grave (níveis de atividade de fator VIII inferior a 1%) registrados no Hemominas, foram selecionados para este estudo. Nós caracterizamos 50 pacientes, dos quais, 8 tinham inv1, 29 tinham inv22 e os pacientes restantes apresentaram mutações sem sentido, mutações de sentido trocado e mutações de mudança de fase de leitura. Posteriormente, um grupo de 40 pacientes, registrados no hemocentro de Campinas e com diagnóstico molecular (32 tinham inv 22 e os pacientes restantes apresentaram mutações sem sentido, mutações de sentido trocado e mutações de mudança de fase de leitura) foram arrolados em nosso estudo. Informações a cerca de inibidores e perfil sorológico de 90 pacientes foram coletadas a partir de prontuários médicos. Dados moleculares e clínicos foram comparados por meio de análises estatísticas. As análises estatísticas não revelaram uma correlação positiva entre as diferentes categorias de mutação e a presença/ausência de inibidores sob influência do perfil sorológico.

Abstract

Hemophilia A, an X-linked bleeding disorder, is caused by the deficiency or dysfunction of coagulation factor VIII (FVIII). The disease results from genetic alterations in the factor VIII gene (*F8*). Clinically, the HA is characterized by bleeding in various part of the body and the recommended treatment is the replacement of deficient FVIII. The development of inhibitory antibodies to the FVIII is the greatest complication in the management of hemophilia A. These antibodies neutralize the activity of FVIII and therefore invalidate the therapy. The risks for development these antibodies are multifactorial and involve genetic and environmental factors. The aim of this study was to determine the molecular basis of severe hemophilia A and its correlation with the development of inhibitors in association with the serological profile for viral diseases. The molecular analysis consisted of determining the intron 1 and 22 inversions (inv1 and inv22) and other genetic alterations present in *F8* coding region by sequencing. Initially, 150 patients with severe HA (factor VIII activity levels below 1%) registered in Hemominas treatment center were selected for this study. We characterized 50 patients, in whom 8 had inv1 and 29 had inv22. The remaining patients presented nonsense, missense and frameshift mutations. Later, a group of 40 patients, registered in Unicamp treatment Center and with molecular diagnosis (32 had inv22 and the remaining patients present nonsense, missense and frameshift mutations) were enrolled in our study. Information about inhibitors and serological profile of 90 patients were collected from medical records. Molecular and clinical data was compared using statistical analysis. Statistical analysis did not reveal a positive correlation between the different categories of mutation and the presence / absence of inhibitors under the influence of the serologic profile.

1 Introdução

1.1 A coagulação na Idade Antiga

“...Pois a alma da carne está no sangue”
(Levítico 17:11)

A associação do sangue com a vida é um dos conceitos mais primitivos da humanidade. Referências sobre sua importância podem ser encontradas em textos religiosos do Cristianismo, Judaísmo e Islamismo, bem como em relatos de crenças e rituais de diversas culturas. O sangue sempre foi objeto do interesse de vários investigadores que, utilizando variadas formas de observação, intuição e experimentação, deram sua contribuição para a construção do que hoje entendemos deste fluido essencial à vida^{1,2}.

Dentre os temas relacionados ao sangue que despertaram a curiosidade de investigadores, sem dúvida, a coagulação foi um dos mais fascinantes. As primeiras explicações para o fenômeno foram dadas pelos antigos filósofos Hipócrates (c. 400 a.C.), Aristóteles (c. 350 a.C.) e Galeno (c. 130-200 a.C.) que relacionaram a coagulação a quatro teorias: a teoria do resfriamento, a teoria do contato com o ar, a teoria da perda da força vital e a teoria da perda do movimento. Estes conceitos permaneceram praticamente sem modificações por séculos e ainda exerceram influência no pensamento de vários investigadores³.

1.2 A coagulação na Idade Moderna

“... The blood is the generative part, the fountain of life, the first to live, the last to die, and the primary seat of the soul...”
(William Harvey)

Uma das significativas contribuições para o conhecimento da coagulação foram os trabalhos do médico e anatomista William Harvey que, em 1628, publicou sua obra “*Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus*”. Nesta obra, conhecida como “*de motu cordis*”, Harvey fez postulações sobre a circulação do sangue e sua fluidez, considerando o coração como doador do espírito vital⁴.

Graças aos conhecimentos sobre a circulação do sangue advindos dos trabalhos de Harvey, o médico italiano Marcello Malpighi publicou em 1661 a obra “*De Pulmonibus*”. Nesta, ele definiu o sangue como uma substância que flui continuamente através de artérias e veias, que contém um número infinito de partículas e que é constituída por duas partes diferentes, uma esbranquiçada, que denominou soro, e outra vermelha. Além disso, Malpighi teorizou que a fluidez do

sangue deve-se ao seu movimento incessante. Mais tarde, em 1666, Malpighi publicou a obra "*De polypo Cordis*", onde fez referências ao líquido hemático resultante da lavagem dos coágulos sanguíneos, além de observações microscópicas sobre os corpúsculos avermelhados denominados de "*atoma rubra*" em referência às hemácias^{5,6}.

O século XVIII trouxe concepções fisiológicas para o fenômeno da coagulação. Uma delas foi demonstrada pelo médico Jean Louis Petit. Em 1731, ele descreveu coágulos em artérias lesionadas de indivíduos vivos, comprovando que a coagulação não era apenas uma ocorrência após a morte e que a mesma participava da contenção da hemorragia³.

Já na segunda metade do século XVIII, em 1770, o médico Willian Hewson combateu a teoria do resfriamento e comprovou experimentalmente que o frio, ao contrário do preconizado até então, inibia a coagulação. Além disso, demonstrou que a adição de alguns sais tornava o sangue incoagulável e que a coagulação ocorria na ausência de glóbulos vermelhos, consolidando a coagulação como uma propriedade do plasma. Esta propriedade foi denominada linfa coagulável, que seria mais tarde reconhecida como fibrinogênio⁷.

1.3 A coagulação na Idade Contemporânea

Ao longo do século XIX, ocorreram várias descobertas importantes no campo da coagulação e estas consolidaram o conceito de que a coagulação era um fenômeno do qual participavam diversas substâncias, algumas delas oriundas de tecidos. Foram especialmente importantes as descobertas ocorridas a partir da metade do século, dentre elas: a proposição do fibrinogênio como precursor da fibrina (Rudolf Virchow, 1856), a descoberta da trombina (Alexander Schmidt, 1861), o isolamento do fibrinogênio em sua forma mais pura (Olav Hammerstein, 1877), a descrição da protrombina (Cornelis Pekelharing, 1888) e a descoberta da importância do íon cálcio no processo da coagulação (Maurice Arthus, 1890). Estas descobertas foram fundamentais para a elaboração da teoria clássica da coagulação publicada em 1905 por Paul Morawitz⁸.

Segundo Morawitz, a coagulação ocorre em duas etapas, sendo que na primeira, ocorre conversão da protrombina em trombina mediante a ação do fator tecidual (FT) e presença de cálcio e na segunda, ocorre conversão do fibrinogênio em fibrina mediante ação da trombina⁹(Figura 1).

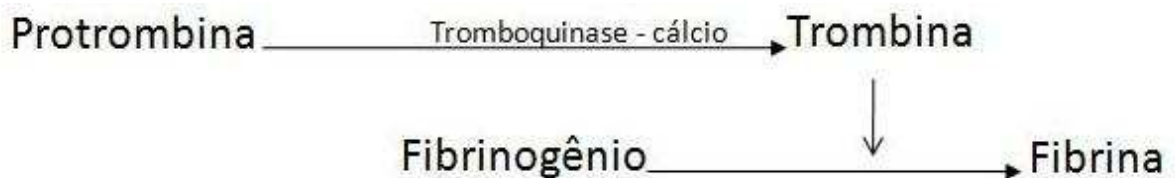


Figura 1. Representação esquemática da teoria clássica da coagulação proposta por Paul Morawitz em 1905. (Adaptada de Izaguirre-Ávila, 2005⁹).

1.3.1 O modelo da cascata da coagulação

Vários estudos sucederam-se ao longo da primeira metade do século XX e resultaram na descoberta de praticamente todos os componentes da coagulação. Dentre eles, a descoberta da vitamina K por (Henrik Dam, 1930) e o desenvolvimento de um método para comprovar a teoria de Morawitz (Armand Quick, 1930). Além da descoberta de outros elementos da coagulação: fator VIII (FVIII) (Arthur Patek, 1936), fator V (FV) (Paul Owren, 1948), fator XIII (FXIII) (Robbins e Laki, entre 1944 e 1948), fator VII (FVII) (André de Vries e Benjamin Alexander, 1949), fator IX (FIX) (Paul Aggeler, Irving shulman, Douglas Stuart e Macfarland, 1952), fator XI (FIX) (Robert Rosenthal, 1953), fator XII (FXII) (Oscar Ratnoff, 1954) e fator X (FX) (Cecil Hougie, 1957). Até a metade da década de 1950, foram descobertos praticamente todos os fatores envolvidos na coagulação. Entretanto, discordâncias quanto à nomenclatura atribuída por diferentes pesquisadores levou à criação de um comitê internacional para a padronização da nomenclatura dos fatores da coagulação, cuja deliberação final ocorreu em 1958, na cidade de Roma¹⁰.

Uma vez que os fatores da coagulação já estavam descritos, o desafio para os pesquisadores seria a descoberta do papel de cada um destes fatores. Uma importante contribuição nesse sentido ocorreu em 1964, quando os conhecimentos obtidos até então, foram resumidos no modelo da cascata da coagulação proposto simultaneamente por dois grupos de pesquisadores, Oscar Ratnoff e Earl W. Davie dos Estados Unidos e Robert MacFarlane da Inglaterra¹¹.

Segundo o modelo de MacFarlane, Davie e Ranoff, a coagulação do sangue consiste em uma série de reações enzimáticas onde zimogênios (fatores inativos da coagulação) são seqüencialmente ativados através de duas vias isoladas e independentes (via intrínseca e via extrínseca) que convergem para uma via comum até a formação do coágulo. A via intrínseca ocorre pela ativação de um fator de

contato, denominado fator de Hageman (FXII) enquanto a via extrínseca ocorre pela ativação do FVII e FT^{12,13} (Figura 2).

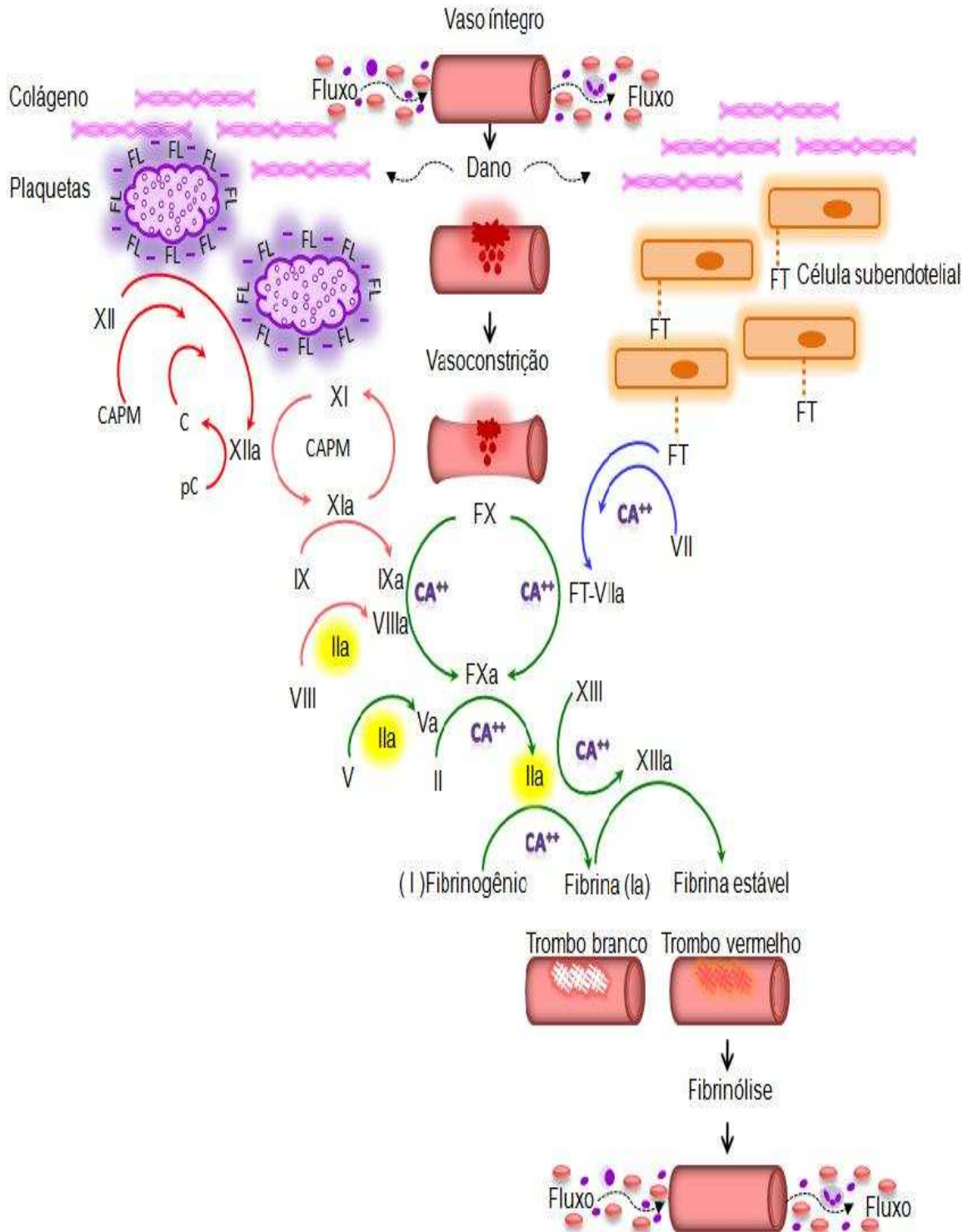


Figura 2. Representação esquemática do modelo da cascata da coagulação. Os fatores da coagulação estão representados em algarismos romanos e suas respectivas formas ativas estão acompanhadas da letra "a". Linhas vermelhas, azuis e verdes representam as reações das vias intrínseca, extrínseca e comum, respectivamente. CAPM, cininogênio de alto peso molecular; pC, pré-caliceína; C, caliceína; FL, fosfolípidos; FT, fator tecidual; Ca⁺⁺, íon cálcio. (Dados compilados a partir de Spronk et al., 2003¹⁴ e Riddel et al., 2007¹⁵).

A partir da segunda metade do século XX, foram descobertos outros componentes relacionados com a coagulação, tais como o sistema fibrinolítico e as vias de regulação da coagulação: via da antitrombina (AT-III), o sistema proteína C (PC) / proteína S (PS) / trombomodulina e o inibidor da via do fator tecidual (TFPI). Além disso, a descoberta das inúmeras relações entre a coagulação e outros sistemas de defesa do organismo, como a inflamação, o sistema de complemento e a regulação do tônus e crescimento vascular ampliaram o papel fisiológico da coagulação. Em paralelo, os avanços nos campos da genética, bioquímica e biologia molecular possibilitaram, ao final do século XX, reunir um extenso conhecimento sobre as proteínas do sangue que participam da hemostasia e, por conseguinte, elucidar a fisiopatologia de várias doenças hemorrágicas e trombóticas¹⁰ (Tabela 1).

Tabela 1. Proteínas envolvidas no processo da hemostasia com respectivas localizações cromossômicas, local de expressão, localização e função.

Componente	Cromossomo	Local de expressão	Localização	Função
I / Fibrinogênio	4	Fígado	Plasma	Precursor
II / Protrombina	11	Fígado	Plasma	Zimogênio
III / FT	1	Células extravasculares	Subendotélio	Cofator
IV / Íon cálcio	*	*	Plasma	Cofator
V/ Pro-acelerina	1	Fígado	Plasma	Cofator
VII / Pro-convertina	13	Fígado	Plasma	Zimogênio
VIII / Fator anti-hemofílico	X	Fígado	Plasma	Cofator
IX / Fator de Christmas	X	Fígado	Plasma	Zimogênio
X / Fator de Stuart-prower	13	Fígado	Plasma	Zimogênio
XI / Antecedente Tromboplastina Plasmática	4	Fígado	Plasma	Zimogênio
XII / Fator de Hageman	5	Fígado	Plasma	Zimogênio
XIII / Fator Estabilizante da fibrina	1, 6	Fígado	Plasma	Zimogênio
Fator de Von Willebrand	12	Endotélio/megacarócitos	Plasma	Carreador
Pré-caliceína / Fator de Fletcher	4	Fígado	Plasma	Zimogênio

Cininogênio de Alto Peso Molecular/Fator de Fitzgerald	3	Fígado	Plasma	Cofator
Trombomodulina	20	Endotélio	Endotélio	Cofator
Antitrombina III	1	Fígado/endotélio	Plasma	Inibidor
Proteína C	2	Fígado	Plasma	Zimogênio
Proteína S	3	Fígado	Plasma	Inibidor Cofator
Inibidor da via do fator tecidual	2	Endotélio	Plasma	Inibidor
Plasminogênio	6	Fígado	Plasma	Zimogênio
Alfa2 antiplasmina	18	Fígado	Plasma	Inibidor
Ativador do plasminogênio tecidual	8	Vários tecidos	Fluidos Extracelulares	Cofator
Ativador do plasminogênio uroquinase	10	Vários tecidos	Fluidos Extracelulares	Cofator
Inibidor do ativador de plasminogênio 1	7	Tecido adiposo	Plasma	Inibidor
Inibidor do ativador de plasminogênio 2	18	Placenta	Plasma	Inibidor
Receptor do ativador do plasminogênio uroquinase	19	Macrófago/monócito	Membrana	cofator

Fatores da coagulação estão representados em algarismos romanos. (*), não se aplica. (Dados compilados a partir de Patrushev, 2002¹⁶; Butenas & Mann, 2002¹⁷ e Lichtman et al., 2001¹⁸).

1.3.2 O novo modelo da coagulação

Embora o conceito da cascata da coagulação tenha representado um significativo avanço na compreensão da coagulação e tenha servido por muitos anos como um modelo útil, estudos clínicos e observações experimentais mais recentes demonstraram que este modelo não explica adequadamente os mecanismos que levam à hemostasia *in vivo* e também não fornece informações suficientes da fisiopatologia do sistema hemostático¹⁹.

Pacientes com deficiências de FXII, de PC, ou CAMP não apresentam tendências hemorrágicas, embora a deficiência destes componentes altere significativamente os ensaios de coagulação *in vitro*, em especial, o tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA)²⁰

Por outro lado, o modelo da cascata da coagulação não explica a tendência hemorrágica nas deficiências de FVIII e FIX, considerando que a via extrínseca

intacta poderia ser um caminho alternativo para a geração de trombina²¹. Da mesma forma, pacientes com deficiência de FVII também exibem tendências hemorrágicas apesar da via intrínseca estar preservada. Estas colocações demonstram que é pouco provável que a vias intrínseca e extrínseca operem de modo independente *in vivo*²². Em função destas observações, foi proposto um novo modelo para a coagulação, enfatizando a hemostasia enquanto processo *in vivo* que será discutido adiante.

1.4 A hemostasia

A hemostasia é um mecanismo de defesa fisiológico que mantém a integridade anatômica e funcional do sistema vascular. Sua função é manter o sangue em estado fluido, além de responder rapidamente ao dano vascular, por meio da formação de um tampão hemostático prevenindo a hemorragia^{23,24}.

Este mecanismo dinâmico envolve o equilíbrio entre sistemas pró/anticoagulantes e sistemas pró/antifibrinolíticos, prevenindo tanto a hemorragia quanto a formação de trombos na luz vascular (Figura 3).

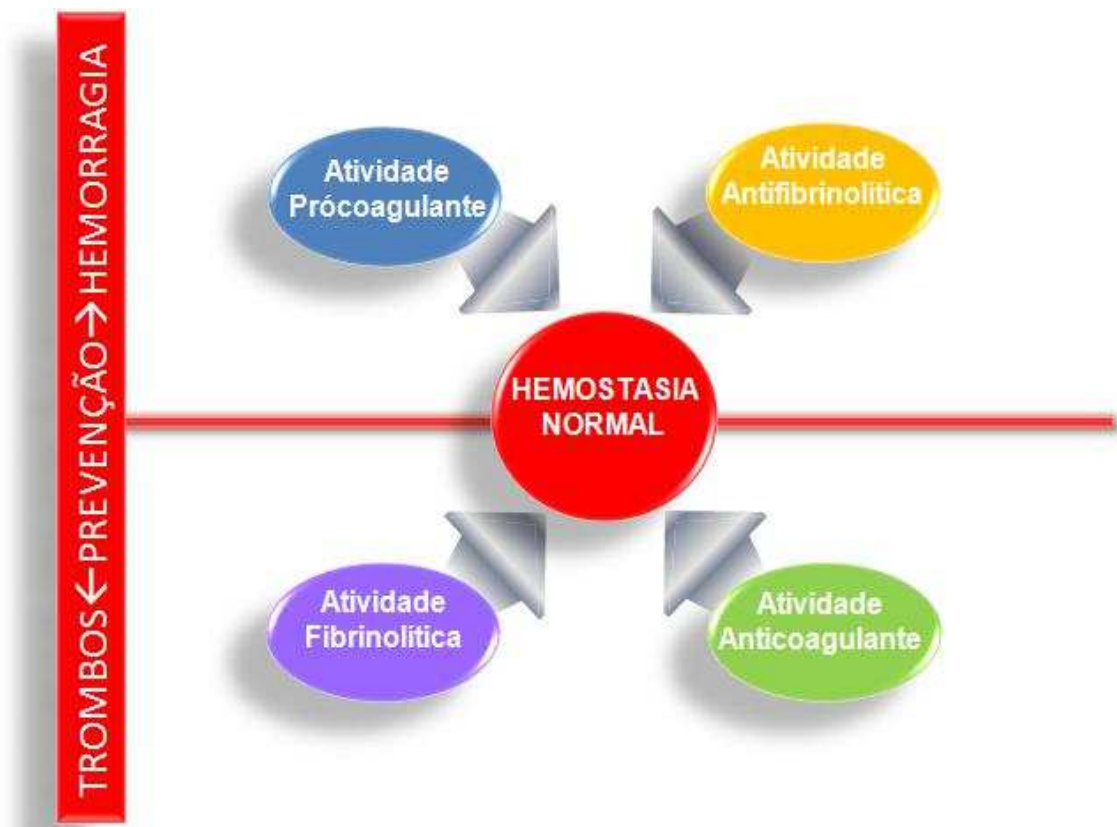


Figura 3. Representação esquemática dos sistemas hemostáticos que contribuem para o equilíbrio da hemostasia. (Adaptado de Adams et al., 2007²⁴).

Os eventos hemostáticos que ocorrem em resposta ao dano vascular, indiferente de sua natureza, envolvem processos biológicos interligados, dos quais participam componentes da parede do vaso sanguíneo, incluindo células endoteliais e subendotélio, e componentes do sangue incluindo as células sanguíneas, os fatores de coagulação e as proteínas fibrinolíticas e anticoagulantes^{25,15}.

Embora os processos fisiológicos envolvidos no sistema hemostático sejam dinâmicos e inter relacionados, eles são didaticamente divididos em três estágios: a hemostasia primária, a hemostasia secundária e a hemostasia terciária, respectivamente, relacionados à adesão/agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise²⁶.

1.4.1 A hemostasia Primária

A hemostasia primária envolve principalmente o endotélio vascular, as plaquetas, as proteínas de adesão e seus receptores. O endotélio vascular é formado por uma monocamada de células que controlam as trocas seletivas entre as moléculas do sangue e tecidos extras vasculares. Além disso, desempenha um papel ativo na regulação da patência vascular por meio da expressão de moléculas pró e anticoagulantes²⁷ (Figura 4).

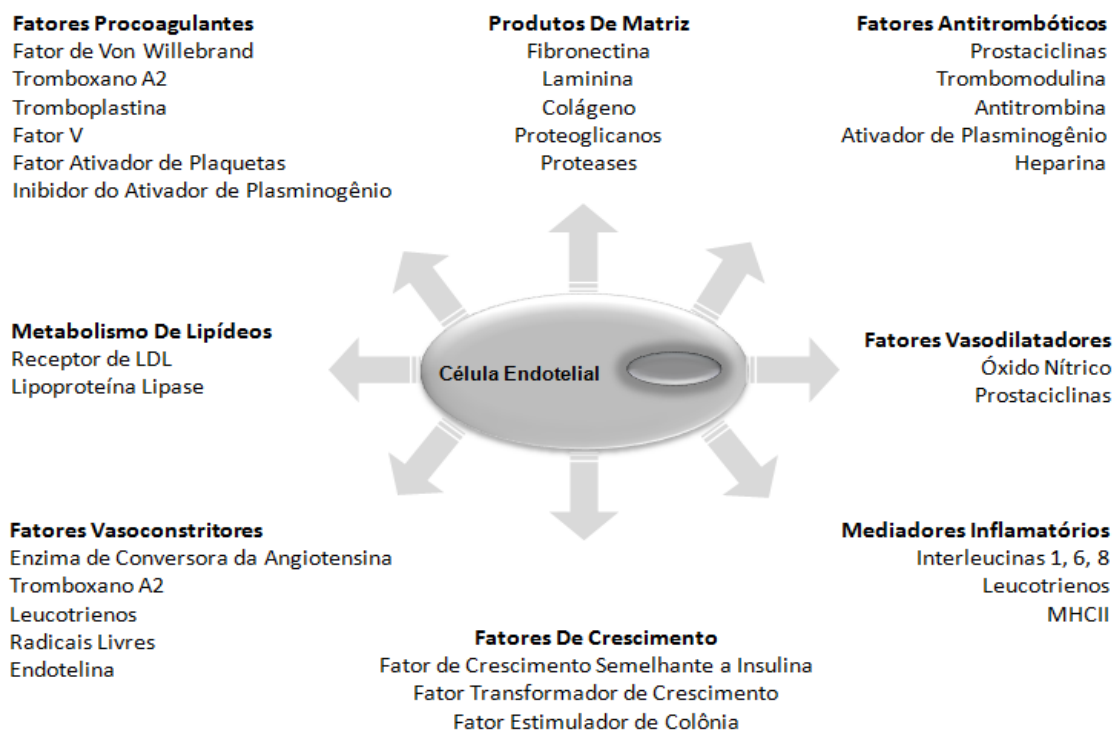


Figura 4. Representação esquemática das funções metabólicas e de síntese da célula endotelial. LDL, lipoproteína de baixa densidade; MHCII, Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II. (Adaptado de Galley & Webster, 2004²⁷).

A superfície luminal do endotélio normal exibe propriedades antitrombóticas em função da: 1) exposição de glicosaminas “heparin-like” carregadas negativamente e fosfolípidos neutros na camada externa das membranas das células; 2) secreção de inibidores de plaquetas incluindo prostaciclina e óxido nítrico; 3) secreção de inibidores da coagulação, como trombospondina, PS e TFPI 4) secreção de ativadores da fibrinólise como os ativadores do plasminogênio tecidual (u-PA e t-PA)²⁸.

Quando ativadas por lesão tecidual ou estímulo agressivo como citocinas inflamatórias, endotoxinas ou hipóxia, as propriedades antitrombóticas das células endoteliais convertem-se em propriedades protrombóticas, caracterizada pela exposição de FT, fosfolípidos aniônicos na superfície externa da membrana celular, secreção de ativadores de plaquetas, exposição de receptores para fatores e cofatores de coagulação e secreção de inibidores da fibrinólise. Adicionalmente, o subendotélio possui componentes altamente trombogênicos, como colágeno, fator de von Willebrand (FvW) e outras moléculas envolvidas na adesão/agregação plaquetária²⁹.

As plaquetas são pequenos fragmentos celulares anucleados produzidos a partir da protusão citoplasmática dos megacariócitos da medula óssea. Elas são liberadas na circulação com pró-plaquetas e, por aproximadamente 10 dias, circulam no sangue como sentinelas da integridade vascular³⁰.

A membrana citoplasmática das plaquetas tem estrutura trilaminar, sendo constituída por bicamada fosfolipídica enriquecida de colesterol, glicolípídeos e glicoproteínas que atuam como receptores. Internamente, as plaquetas são constituídas por um complexo sistema de membranas, estruturas de citoesqueleto (microtúbulos e microfilamentos) e organelas que incluem peroxissomos, pequeno número de ribossomos, mitocôndrias, lisossomos e vesículas especializadas, grânulos densos e grânulos alfa cujos distintos componentes têm papel crítico na função plaquetária³¹.

Mais de 300 proteínas são integrantes dos grânulos plaquetários. Grânulos densos contêm principalmente difosfato de adenosina (ADP), trifosfato de adenosina (ATP), serotonina e cálcio. Grânulos alfa contêm, dentre outros componentes, FvW, fator 4 plaquetário, fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fibrinogênio, fibronectina, vitronectina, trombospondina plaquetária, FV e P-selectinas³².

O FvW e fibrinogênio são as principais proteínas adesivas envolvidas na hemostasia primária. O FvW é uma glicoproteína multimérica sintetizada pelas

células endoteliais e pelos megariócitos³³. Ele é estocado nos corpos de Weibel-Palade das células endoteliais e em grânulos alfa de megacariócitos e plaquetas, além de estarem presentes no plasma circulante³⁴.

O fibrinogênio é uma glicoproteína solúvel composta por três pares de cadeias polipeptídicas, alfa, beta e gama. É sintetizado predominantemente no fígado e secretado para o plasma, onde tem uma meia-vida de cerca de 100 horas³⁵.

Os eventos da hemostasia primária são desencadeados em resposta a um dano à parede vascular. A primeira resposta ao dano vascular é a constrição muscular da parede do vaso que é mediada por três mecanismos: espasmos neurogênicos, esfíncteres pré-capilares e espasmo de ordem humoral, cujo objetivo é reduzir o fluxo sanguíneo no local da lesão³⁶.

Durante a fase inicial, as plaquetas rolam, aderem e cobrem o subendotélio com uma monocamada de plaquetas. Durante esta fase de rolagem, a adesão é mediada pela interação entre glicoproteínas presentes na superfície da membrana e componentes do subendotélio. Inicialmente ocorre a interação do complexo de glicoproteínas Ib/V/IX (GPIb/V/IX) com o FvW e, em seguida, ocorre a interação da glicoproteína VI (GPVI) e glicoproteína Ia (GPIa) com o colágeno, no sítio do dano vascular^{37,38}(Figura 5).

O complexo GPIb/V/IX liga-se a outras proteínas adesivas como colágeno, trombospondina, CAMP, FXI e FXII. A interação entre glicoproteínas plaquetárias e componentes do endotélio desencadeiam eventos de sinalização intracelular que induzem a liberação de mediadores secundários como o ADP, tromboxano A2 (TXA2) e serotonina. Além destes, traços de trombina gerada localmente interagem com receptores específicos da superfície das plaquetas e desencadeiam eventos de sinalização intracelular que promovem a completa ativação plaquetária. Esta ativação inclui essencialmente a modificação morfológica da plaqueta e a conversão do receptor de glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) para uma forma ativa, que passa a ter afinidade com fibrinogênio e FvW produzindo pontes estáveis entre as plaquetas e assegurando a agregação plaquetária^{39,40} (Figura 5).

1.4.2 A hemostasia secundária

A hemostasia secundária é hoje compreendida sob a visão de um modelo que enfatiza a coagulação enquanto um processo *in vivo*. De acordo com o modelo celular da hemostasia, a coagulação é dividida em três etapas sobrepostas:

O FT, também conhecido como fator III da coagulação ou tromboplastina tecidual, é uma glicoproteína transmembrana constitutivamente expressa por muitas células extra vasculares. Ele possui altos níveis de expressão no coração, cérebro, pulmão, testículos, placenta e rins. Além disso, há relatos contraditórios sobre a síntese de FT em células do sangue e sobre a presença ou ausência de funcionalidade no sangue circulante, quer como proteína solúvel, quer como micropartículas^{44,45}.

A fase de iniciação é marcada pela exposição do FT e por subsequente interação com o FVII endógeno presente na circulação. O FT atua como receptor e cofator para a ativação do FVII e o complexo FT/FVII ativado (FT/FVIIa) resultante catalisa a ativação do FX e do FIX^{46,47}. O FIX ativado (FIXa) e o FX ativado (FXa), formados na superfície das células que expressam FT, possuem distintas e separadas funções na iniciação da coagulação. O FIXa não atua sobre a superfície das células contendo FT, mas pode difundir-se para superfície das plaquetas ativadas próximas ao sítio da lesão vascular. Já o FXa pode ativar proteoliticamente o FV plasmático. A interação de FXa e FV ativado (FVa) resulta em produção de quantidades pequenas de trombina. A quantidade de trombina inicialmente gerada é insuficiente para a formação do coágulo, mas é suficiente para retroalimentar a coagulação através da ativação dos FV, FVIII e de receptores da superfície plaquetária⁴⁸ (Figura 6).

A fase de amplificação inicia-se a partir da interação da trombina com receptores plaquetários. Embora as plaquetas já estejam aderidas ao subendotélio e parcialmente ativadas, a interação da trombina com o receptor ativador de protease 1 (PAR-1) resulta na liberação de FV parcialmente ativado (presente nos grânulos alfa) para a superfície plaquetária. O FV parcialmente ativado é rapidamente convertido para a forma completamente ativa por ação da trombina ou do FXa. Remanescentes de trombina ligados a outros receptores, como GPIb/IX, permanecem ativos e podem ativar outros fatores presentes na superfície plaquetária. O complexo FvW/FVIII, aderido à superfície da plaqueta, é dissociado promovendo a ativação do FVIII (FVIIIa) que permanece ligado à superfície plaquetária⁴⁹(Figura 6).

As plaquetas, completamente ativadas em associação com o FVa e FVIIIa, promovem a montagem dos complexos coagulantes durante a fase de propagação. O FIXa associa-se ao seu cofator, FVIIIa, e em presença de fosfolípidos plaquetários e íon cálcio, forma o complexo tenase, que converte mais FX a FXa. FXa, por sua

vez, associa-se ao seu cofator, FVa, e em presença de fosfolípidos plaquetários e íon cálcio, forma o complexo protrombinase. Este complexo é capaz de converter protrombina em trombina em quantidades suficientes para converter fibrinogênio em fibrina, e ainda ativar FXIII (FXIIIa), que por sua vez, promove a estabilização da rede de fibrina. Adicionalmente, a geração de trombina pode converter FXI a FXIa, que pode converter mais FIX a FIXa, levando à formação de quantidade adicional de trombina⁵⁰ (Figura 6).

1.4.3 A hemostasia terciária ou fibrinólise

A última etapa da hemostasia refere-se à lise do coágulo formado após o reparo tecidual. Esta ação é realizada pelo sistema fibrinolítico, que envolve basicamente a proenzima inativa plasminogênio (Plg) e seus respectivos ativadores, o ativador do plasminogênio tecidual (t-PA) e o ativador de plasminogênio uroquinase (u-PA), os inibidores da ativação de Plg, o inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1) e o inibidor do ativador de plasminogênio-2 (PAI-2), os inibidores da plasmina (Pln), a α_2 -antiplasmina (α_2 -AP) e a α_2 -macroglobulina (α_2 -MG) e o inibidor do sistema fibrinolítico, o inibidor fibrinolítico ativado por trombina (TAFI)⁵¹ (Figura 7).

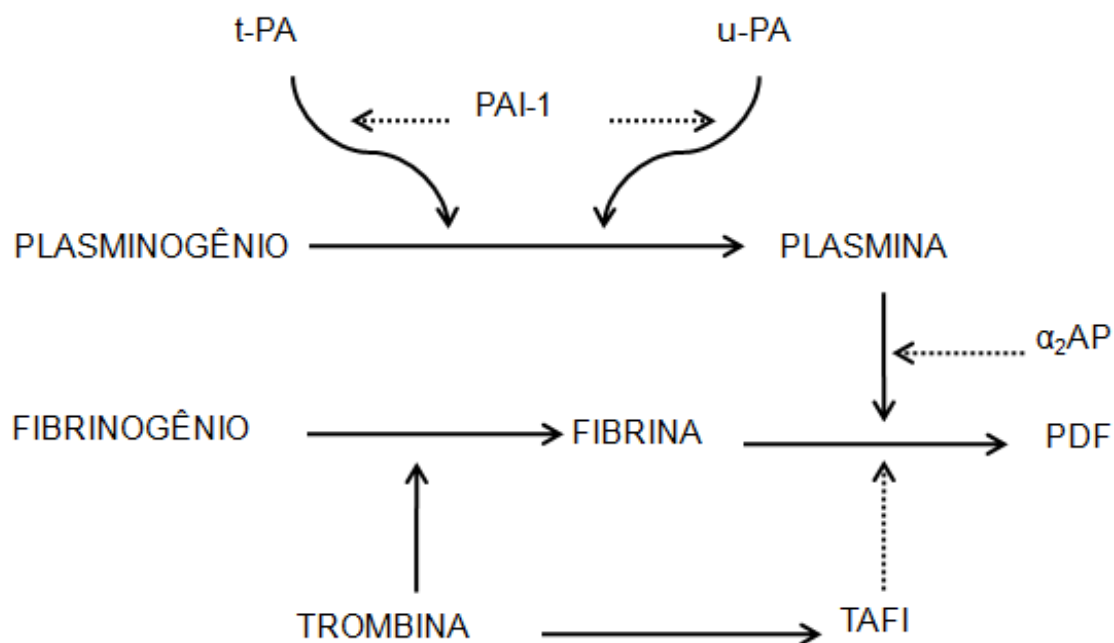


Figura 7. Representação esquemática da degradação da fibrina pelo sistema fibrinolítico. t-PA, ativador de plasminogênio tecidual; u-PA, ativador de plasminogênio uroquinase; PAI-1, inibidor do ativador de plasminogênio 1; α_2 -AP, α_2 -antiplasmina; PDF, produto de degradação da fibrina; TAFI, inibidor fibrinolítico ativado por trombina. As linhas pontilhadas indicam inibição e as linhas cheias ativação das vias. (Adaptado de Rijken e Lijnen, 2009⁵²).

A fibrina não é um substrato passivo, pois uma vez formada, atua como cofator para a conversão de Plg a Pln, o principal mediador da fibrinólise. A fibrina, uma vez formada, expõe sítios críticos que apresentam resíduos de lisina carregados positivamente, nos quais se ligam Plg, presente no sangue circulante, e t-PA secretado pelas células endoteliais durante a formação do coágulo. O t-PA, em presença de fibrina, ativa o Plg a Pln. Esta, por sua vez, cliva sítios posteriores aos resíduos de lisina e arginina das cadeias α e β da molécula de fibrina, resultando na formação de produtos de degradação da fibrina (PDF). Esta estrutura de fibrina alterada deixa exposta a porção carboxi terminal dos resíduos de lisina que propiciam sítios adicionais para a ligação de Pln e t-PA que contribuem para a propagação da fibrinólise⁵³.

1.4.4 A regulação da hemostasia

Para que o sistema hemostático permaneça em equilíbrio é necessário um sistema de regulação e controle da coagulação sanguínea. A regulação da coagulação, da geração de trombina e de fibrina é efetuada mediante ação de diferentes inibidores. Estes devem permanecer ativos durante um período suficiente para exercer seu papel como anticoagulantes^{24,54}.

Dos sistemas de regulação da coagulação, destacam-se: (1) a via da AT-III, (2) a via do TFPI e (3) a via da PC. A AT-III é um inibidor plasmático capaz de neutralizar várias proteases da coagulação, dentre elas, o FXIa, FXa, complexo FT/FVIIa e a própria trombina. Entretanto, os níveis de inibição são insuficientes para controlar todo o processo da coagulação⁵⁵; O TFPI, que é constitutivamente liberado a partir das células endoteliais, atua sobre o complexo FT/FVIIa; A PC, uma glicoproteína que circula sob forma inativa, tem sua ativação depende da interação da trombina com o receptor de membrana trombomodulina, expresso constitutivamente pelas células endoteliais, assim como da sua interação com o receptor de membrana da PC, chamado de receptor de proteína C endotelial (EPCR). Para tornar-se ativada, a PC deve dissociar-se do seu receptor e ligar-se ao seu cofator, a PS. O complexo PC ativada/PS pode inativar tanto FVa quanto FVIIIa, reduzindo a formação dos complexos protrombinase e tenase e, por conseguinte, reduzindo a geração de trombina^{57,58}.

Além dos sistemas citados acima, um novo mecanismo de regulação foi descrito em 1997. Trata-se do sistema proteína Z / inibidor de protease dependente

da proteína Z (PZ/IPZ). A PZ é uma glicoproteína plasmática dependente de vitamina K que exibe homologia com outros fatores dependentes de vitamina K (F VII, FIX, FX e PC), mas que, em contraste com estes fatores, não possui atividade enzimática. Entretanto, atua como cofator para a regulação da coagulação mediante a formação de um complexo com o IPZ^{59,60}. O IPZ inibe o FXa em um processo que requer a presença de PZ, íons cálcio e cefalina. Além disso, o IPZ, em presença de heparina, inibe duas vezes mais o FXIa sem o requerimento de PZ, íons cálcio ou fosfolípidos. Estudos recentes também demonstraram que níveis sub-fisiológicos do IPZ são eficientes para a inibição do FIXa sem o requerimento de PZ⁶¹.

1.5 Doenças do sistema hemostático

A compreensão dos processos biológicos envolvidos na hemostasia, bem como os avanços no diagnóstico laboratorial para a avaliação específica de seus componentes tornaram possível o conhecimento tanto de causas genéticas quanto adquiridas que interferem no equilíbrio hemostático e que podem acarretar o desenvolvimento de processos trombóticos e/ou hemorrágicos^{62,63}. Dentre as diversas doenças que acometem o sistema hemostático podemos citar as doenças plaquetárias^{64,65}, as doenças do endotélio^{66,67}, os defeitos na função dos fatores de coagulação⁶⁸ e ainda as doenças que predis põem à trombofilia^{69,70}. A mais comum das doenças hereditárias da coagulação descrita em humanos é a doença de von Willebrand (DvW), seguido pelas hemofilias⁷¹.

1.6 As hemofilias na perspectiva histórica

Do ponto de vista evolutivo, a origem da hemofilia remonta ao período cretáceo, a cerca de 65 milhões de anos atrás. Ela aparece em pelo menos três ordens de mamíferos placentários e foi descrita em cavalos, em nove raças de cães e em humanos^{72,73}.

O primeiro relato referente a uma doença hemorrágica creditada à hemofilia encontra-se registrado em um decreto do Talmude do Século II. Nele, o Patriarca Judah isenta da circuncisão o terceiro filho de uma mulher cujos dois primeiros filhos faleceram após o procedimento. Este decreto reconheceu uma doença hemorrágica familiar e ligada ao sexo e foi incorporado às edições posteriores do Talmude. Ainda, na Idade Média, encontram-se registros do médico árabe Abul El Kassam

(Albucasis) que viveu em Córdoba no ano de 1107. Ele descreveu homens de um vilarejo que faleciam por hemorragia após pequenos ferimentos⁷⁴.

A história moderna da hemofilia começou apenas no século XIX com a publicação de um extenso estudo realizado por John C. Otto em 1803. Após este estudo, diversos relatos isolados foram descritos até que em 1820, Nasse fez uma publicação de cunho mais científico, onde relata todos os casos disponíveis até então e uma revisão geral sobre a doença. Em 1828, um estudante de Schölein, Hopf publica a dissertação intitulada "*Die Hamophilie*". É neste relato que o termo hemofilia é relatado pela primeira vez. Até então, a doença havia sido denominada por diversos termos como hemorragia, hematofilia, hemorrea, hemorragia, idiosincrasia hemorrágica e morbus hemático. Quase cinquenta anos mais tarde, em 1872, J.W. Legg publica o primeiro tratado sobre hemofilia denominado "*A treatise on Haemophilia*", onde descreve a transmissão genética da doença, suas características e formas clínicas^{75,76}.

Ao longo do século XIX, a hemofilia tornou-se largamente conhecida como "Doença Real". Alianças políticas, consolidadas por meio de casamentos entre membros de famílias reais, fizeram com que descendentes da Rainha Vitória da Inglaterra (1819-1901) transmitissem o gene afetado para as famílias reais da Prússia, Espanha e Rússia. Sem dúvida, a "doença real", hoje reconhecida como um caso de hemofilia B contribuiu para importantes eventos da história europeia e tornou-se um dos mais evidentes exemplos de uma doença recessiva ligada ao X⁷⁷.

No início do século XX, mais precisamente em 1911, é publicada a mais detalhada monografia até então sobre a doença. Bulloch e Fildes realizaram um trabalho com quase mil referências e relatos de casos, além de análise de mais de duzentas árvores genealógicas distinguindo casos de hemofilia por sexo, sintomas e hereditariedade de numerosos outros casos inexplicáveis de hemorragias. Embora mais de um século separe os trabalhos de Otto e Fildes, eles têm em comum a mesma afirmação quanto ao papel da mulher na transmissão da doença. Ao longo do século XX, a história da hemofilia seguiu paralelamente à evolução dos estudos da coagulação, principalmente aqueles relacionados à identificação do FVIII e FIX que permitiram distinguir entre hemofilia A e hemofilia B^{72,78}.

O principal avanço da década de 60, com relação à hemofilia A, foi a descoberta do crioprecipitado que representou um papel chave para o tratamento da hemofilia⁸⁰. As décadas de 80 e 90 foram marcadas por um paradoxo. Por um lado, os avanços tecnológicos aperfeiçoaram a qualidade do isolamento do FVIII no

sangue e permitiram a clonagem do gene resultando em grande melhoria na qualidade diagnóstica e na disponibilidade de tratamento. Por outro lado, a ocorrência de casos de contaminação por agentes infecciosos como o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e os vírus hepatite, reconhecidamente transmitidos pela infusão de hemoderivados, representaram um grande desafio. A comunidade científica reagiu prontamente com a introdução de testes para a detecção de doenças infecciosas em bancos de sangue e com introdução da inativação viral nos concentrados de fator. Além disso, os avanços no campo da biologia molecular permitiram a produção do fator recombinante, como uma opção segura quanto à transmissão de infecções, assim como a identificação molecular das mutações associadas à hemofilia, que por sua vez tornaram possíveis o diagnóstico pré-natal e a investigação de portadora⁸¹.

1.7 As hemofilias na perspectiva atual

As hemofilias são distúrbios hemorrágicos resultantes da deficiência de fatores específicos da coagulação. Esta deficiência pode ter caráter adquirido ou congênito. As formas adquiridas são decorrentes do desenvolvimento de anticorpos direcionados contra domínios específicos destes fatores. Embora essas formas sejam normalmente relacionadas com puerpério, com doenças auto-imunes ou neoplásicas, ou mesmo com o uso de alguns medicamentos, em mais de 50% dos casos a causa é idiopática. O quadro clínico das hemofilias adquiridas é geralmente grave e pode acometer igualmente homens e mulheres⁸². As hemofilias congênitas são decorrentes de alterações genéticas presentes nos genes que codificam FVIII (hemofilia A) e FIX (hemofilia B)^{83, 84,85}.

1.7.1 A hemofilia A

1.7.1.1 Conceito, etiologia e epidemiologia

A hemofilia A, também denominada hemofilia clássica (OMIM 306700), é uma doença hemorrágica recessiva ligada ao X causada pela deficiência ou ausência do FVIII da coagulação devido a alterações genéticas no seu gene codificador (*F8*)⁸⁶. Hemofilia A é a mais comum das doenças hemorrágicas ligadas ao X e é cerca de seis vezes mais prevalente que a hemofilia B⁸⁷. Ela afeta aproximadamente 1 em

cada 5.000 a 10.000 homens⁸⁸. Entretanto, não se observa predisposição étnica ou geográfica da doença⁸⁹.

Levantamentos recentes, a partir de dados da “World Federation of Hemophilia” (WFH), com avaliação em 106 países no período de 1998 a 2006 revelam grande variação na prevalência dos casos em diversos países analisados. Esta variação pode refletir, entre outros fatores, as discrepâncias nas facilidades do diagnóstico da doença entre os países pesquisados⁹⁰.

Segundo dados da WFH, são estimados que existam no mundo mais de 400.000 pessoas com hemofilia⁹¹. De acordo com dados da Coordenação da Política Nacional de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde e do Registro Nacional de Coagulopatias de 2007, o Brasil tem 6881 casos de hemofilia A (62,7% de todas as coagulopatias), sendo que destes 647 casos são do Estado de Minas Gerais^{92,93}.

1.7.1.2 Diagnóstico Laboratorial da hemofilia A

A história familiar e a ocorrência de episódios hemorrágicos são ainda importantes dados para o diagnóstico da hemofilia “A”. Entretanto observa-se que 20-30% dos casos de hemofilia não têm familiares afetados e, além disso, indivíduos com forma clínica leve ou moderada podem não manifestar os sintomas clássicos da hemofilia. Ainda neste contexto, nem os sintomas, nem a história familiar distinguem hemofilia A de hemofilia B⁷⁶.

Os testes de rotina para pacientes com suspeita de doenças hemorrágicas incluem a completa contagem das células sanguíneas, a contagem de plaquetas, a análise do tempo de protrombina (TP) e a análise do TTPA^{94,95}. Tanto a Hemofilia A quanto a Hemofilia B tipicamente apresentam TTPA aumentados e os demais testes de triagem normais. Embora este perfil possa sugerir diagnóstico de hemofilia A ou B, o diagnóstico definitivo requer a mensuração dos níveis plasmáticos de atividade de FVIII ou FIX respectivamente⁹⁶.

Os níveis de atividade coagulante do FVIII (FVIII:C) são mensuráveis tanto por ensaios coagulométricos quanto por ensaios cromogênicos de um ou dois estágios. Os níveis de FVIII:C são normalmente relatados em unidades por mililitro (U/mL), com 1 unidade correspondendo a 100% de atividade do fator encontrado em 1 mL de plasma normal. Níveis normais de FVIII:C usualmente variam entre 0,5 U/mL e 1,5 U/mL (50-150%)⁷⁶. Os níveis de FVIII:C encontrados em portadoras

normalmente são a metade dos níveis normais, entretanto estes testes devem ser realizados em mais de uma ocasião, pois vários fatores podem interferir na mensuração. A reprodutibilidade de níveis normais não exclui a condição de portadora, que pode somente ser identificado a partir do diagnóstico molecular⁸⁵.

1.7.1.3 Manifestações clínicas da hemofilia A

O quadro clínico da hemofilia A é caracterizado pela ocorrência de hemorragias em vários locais, especialmente nos espaços intra-articulares (hemartroses) e nos músculos (hematomas). As articulações mais afetadas são os joelhos, que representam metade de todas as hemartroses, os cotovelos e tornozelos^{97,98}.

Podem ainda ocorrer hemorragias em mucosas e ser observada a presença de sangue na urina (hematúria). Nos casos mais graves podem ocorrer hemorragias em órgãos internos e também no sistema nervoso central. A frequência e a gravidade dos episódios hemorrágicos dependem do nível residual de FVIII:C presente no plasma e sua respectiva funcionalidade⁹⁶.

É em função deste nível de concentração e de atividade que a hemofilia A é usualmente classificada nas formas grave (< 0,01 UI/mL ou <1% do normal), moderada (0,01-0,05 UI/mL ou 1-5% do normal) e leve (>0,05 < 0,40 UI/mL ou >5<40% do normal), segundo normas da “International Society on Thrombosis and Haemostasis” (ISTH)⁹⁹ (anexo 6.1). A prevalência da hemofilia A considerando-se a gravidade é variável. Em geral, a hemofilia leve, moderada e grave ocorre em aproximadamente 40%, 10% e 50% do total de casos, respectivamente¹⁰⁰.

Os pacientes graves classicamente apresentam hemartroses e hematomas espontâneos recorrentes, podendo apresentar 15-35 episódios hemorrágicos ao ano. Pacientes com a forma moderada apresentam hemorragias associadas a pequenos traumas, mas podem eventualmente apresentar eventos hemorrágicos espontâneos. Pacientes com hemofilia A leve normalmente não apresentam hemorragias espontâneas. Nestes, os eventos hemorrágicos ocorrem, em geral, após traumas ou cirurgias ou procedimentos invasivos¹⁰¹. As hemartroses são ocorrências precoces na vida do paciente e nos casos graves, normalmente elas ocorrem quando a criança começa a caminhar. A idade média para a primeira hemorragia articular é 1,91 anos e até a idade de 2 anos cerca de 80% dos indivíduos já tiveram pelo menos uma hemorragia articular¹⁰². Hemartroses repetidas em uma determinada

articulação levam ao desenvolvimento de artropatia crônica caracterizada por dor, perda de função, deformidade, incapacidade física e baixa qualidade de vida¹⁰³.

O número de hemartroses é um preditor significativo para o desenvolvimento da artropatia hemofílica. Estudos relacionando a ocorrência de artropatias e números de hemorragias revelaram que somente articulações com menos de três sangramentos mantêm sua funcionalidade¹⁰⁴.

As hemorragias intracranianas (HIC) são relativamente raras, mas representam uma importante causa de morbidade. Antes da disponibilidade de tratamento por meio da reposição de FVIII, um terço de todas as mortes em indivíduos com hemofilia era em decorrência de HIC. Durante o período neonatal, a HIC acomete de 3,5% a 4% de todas as crianças com hemofilia¹⁰⁵.

1.7.1.4 Tratamento da hemofilia A

Ainda não existe cura para as hemofilias. O tratamento e/ou a prevenção dos eventos hemorrágicos requer a terapia de reposição por meio de infusão intravenosa do concentrado de FVIII. Estes concentrados podem ser derivados do plasma ou ser de origem recombinante (rFVIII)¹⁰⁶. Embora os fatores derivados do plasma tenham se constituído um grave problema na década de 80 e início da década de 90 em função de inúmeras contaminações virais, especialmente com os vírus da hepatite C e do HIV, atualmente estes produtos são considerados muito seguros, graças aos avanços nos processos de inativação viral e dos métodos de purificação por fracionamento¹⁰⁷.

Atualmente existem duas principais abordagens no tratamento da hemofilia: o regime intermitente de reposição (baseado no tratamento sob demanda) e o regime profilático^{108,109}. O tratamento sob demanda refere-se à infusão do concentrado de fator após a ocorrência do episódio hemorrágico. Este tipo de tratamento tem como objetivo coibir o sangramento e evitar o desenvolvimento de hemartroses em articulações alvo e conseqüente artropatia^{110,111}.

O tratamento profilático pode ser do tipo primário ou secundário. A profilaxia primária refere-se à infusão regular de concentrado de FVIII antes da ocorrência de hemorragias, requerendo, para tal, infusão do concentrado de 1 a 3 vezes por semana. Normalmente, este tipo de profilaxia é iniciado em idade tenra (entre 1 e 3 anos de idade) após a primeira e antes de três hemartroses. Este tratamento é indicado somente para pacientes com hemofilia grave. A profilaxia secundária, por

outro lado, refere-se à infusão regular do concentrado de fator após a ocorrência de hemorragia com o objetivo de tratar e consolidar o tratamento da hemorragia¹¹². A terapia gênica representa uma possibilidade de abordagem terapêutica futura, embora, ainda, com resultados pouco satisfatórios em humanos¹¹³⁻¹¹⁵.

1.7.1.5 Complicações do tratamento

1.7.1.5.1 Acesso venoso

Uma das limitações ligadas à terapia de reposição tanto nos regimes profiláticos ou intermitentes é a questão do acesso venoso. Esta questão é importante, especialmente em crianças jovens, nas quais, muitas vezes, é necessária a utilização de cateter venoso central para as frequentes infusões de concentrado de FVIII. Este procedimento está associado com o risco de infecções, falhas mecânicas do cateter e paradoxalmente, com a ocorrência de trombose¹¹⁶⁻¹¹⁸. Trombose associada ao uso de cateter venoso central em pacientes com hemofilia é relativamente rara, mas sua ocorrência está diretamente ligada ao tempo de permanência do cateter e neste caso, o fator desencadeante sugerido seria a irritação crônica promovida pela ponta do cateter na parede do vaso levando à deposição intraluminal de fibrina, especialmente nos momentos intermitentes de normalização da coagulação^{119,120}.

1.7.1.5.2 Infecções virais

As infecções virais são complicações potenciais do tratamento das hemofilias especialmente com concentrados derivados de plasma. Exemplos importantes de contaminação viral são os vírus HIV, vírus das hepatites B e C e o parvovirus B19. A hepatite C é a principal causa de hepatite crônica e co-morbidade em pacientes com hemofilia. Como o tratamento disponível é eficaz em apenas 70% dos casos, muitos pacientes evoluem para a fase final da doença hepática¹²¹. Outra prevalente co-morbidade em pacientes com hemofilia é a infecção pelo HIV¹²² e que causou uma grande devastação na população de pacientes com hemofilia. Outro exemplo de contaminação viral é parvovirus B19, um vírus sem envoltório lipídico, para o qual as técnicas de inativação viral são ineficazes^{123,124}.

1.7.1.5.3 Desenvolvimento de inibidores

O desenvolvimento de aloanticorpos direcionados contra o FVIII infundido (inibidores) ocorre em aproximadamente 25-30% dos pacientes com hemofilia A. Esta resposta é caracterizada pela geração de anticorpos anti FVIII que neutralizam a atividade procoagulante do FVIII infundido. Por esta razão, estes anticorpos são chamados de inibidores do FVIII. Eles são diagnosticados a partir de uma súbita ausência de resposta à terapia de reposição do FVIII e podem ser quantificados por meio do ensaio de Bethesda que avalia a capacidade de neutralização do FVIII do plasma normal. Uma unidade Bethesda (UB) é definida como a quantidade de inibidor que neutraliza 50% do FVIII normal do plasma após duas horas de incubação a 37°C¹²⁵.

A presença do inibidor representa um desafio para o manejo clínico, uma vez que pacientes com inibidor têm maior morbidade, são refratários a infusão de concentrados de FVIII, apresentam hemorragias mais graves e necessitam de tratamento com produtos mais onerosos¹²⁶.

Existem vários fatores de risco genéticos e ambientais considerados como preditores do desenvolvimento de inibidores (Tabela 2), sendo o tipo de mutação relacionada à hemofilia um dos fatores preditores mais importantes. Como exemplo, observa-se que pacientes com grandes deleções possuem um risco de 40% de desenvolverem inibidores, contra um risco de 5% para pacientes com mutações de sentido trocado e de 15% para pacientes com pequenas deleções^{127,128}

Estudos correlacionando o desenvolvimento de inibidores e os tipos de mutação demonstraram que mutações com troca de aminoácidos e pequenas deleções exibiram baixa prevalência de inibidores (cerca de 5%)¹²⁹. Em contraste, grandes deleções, mutações sem sentido e a prevalente inversão do íntron 22 se associaram a maior prevalência (7-10 vezes) de inibidores¹³⁰. Resultados semelhantes foram demonstrados ao estabelecerem a correlação entre aspectos genótipo-fenotípicos e o desenvolvimento de inibidores. Além destes, mutações na cadeia leve do FVIII parecem conferir maior risco de inibidores do que mutações na cadeia pesada¹³¹. A maioria dos inibidores em pacientes com hemofilia A leve/moderada ocorre em associação com mutações de sentido trocado nos domínios A1 e A2 (entre os resíduos 482-501) e na junção C1-C2 do FVIII¹³². Estas mutações estão associadas com risco aumentado de inibidores em até 50%, possivelmente ocasionado por mudança de conformação da proteína^{133,134}. Em

particular, algumas mutações são comumente associadas ao desenvolvimento de inibidores em hemofilia A leve/moderada, sendo estas Arg593Cys, Arg2150His e Trp2229Cys¹³⁵.

A história familiar da presença de inibidores também é um importante fator de risco preditor de desenvolvimento de inibidor. Uma informação interessante é que o risco diminui na mesma proporção em que diminui o grau de parentesco¹³⁶.

Imunogenótipos, incluindo haplótipos de MHC-II, polimorfismo nos genes que codificam o antígeno 4 de linfócito citotóxico (CTLA-4), o fator de necrose tumoral (TNF α) e a interleucina 10 (*IL-10*) são relatados como possíveis preditores para o desenvolvimento de inibidores¹³⁷. Um polimorfismo do tipo microsatélite presente na região promotora do gene da *IL-10* (alelo 134) foi fortemente associado com o desenvolvimento de inibidores. Pacientes com este alelo apresentam aumento da secreção de *IL-10* e constituem fenótipo “alto secretor” que combinado com o fator da coagulação deficiente promove a expansão de clones específicos de linfócitos B e o desenvolvimento de inibidores¹³⁸.

Finalmente, alguns grupos étnicos, como afro-descendentes americanos, e hispânicos têm maior probabilidade para desenvolver inibidores. Não se sabe se estas diferenças observadas são resultantes de polimorfismos na sequência codificadora de *F8* ou se devido às especificidades de imunogenótipos nestes grupos étnicos. A análise de outros grupos étnicos ainda não está bem esclarecida e necessitará de mais estudos¹³⁹.

Os fatores de risco ambientais também são condições importantes para a condução clínica de pacientes com hemofilia. Fatores ambientais associados com maior formação de inibidores incluem principalmente a idade do paciente no início do tratamento, o tipo de produto de FVIII usado, bem como seu modo de administração, a intensidade do tratamento e o impacto de desafios do sistema imune^{129,140}. A força de associação entre o desenvolvimento de inibidores e cada um dos fatores citados é variável de acordo com a literatura. Por exemplo, dados de vários estudos sustentam que a idade da criança na ocasião da primeira administração de FVIII é inversamente associada com o risco de desenvolvimento de inibidores^{141,142}. Em contrapartida, outros trabalhos não confirmaram esta associação quando a idade foi analisada juntamente com fatores genéticos e/ou outros fatores não genéticos, como a intensidade do tratamento¹⁴³⁻¹⁴⁵.

Estudos controversos também são observados quando confrontamos o tipo de produto de FVIII e o desenvolvimento de inibidores. Análises realizadas, a partir

de dois estudos retrospectivos, com pacientes não tratados demonstraram que o uso de rFVIII oferece 2,5-3,0 vezes mais riscos para o desenvolvimento de inibidores que o uso de concentrado de FVIII derivado de plasma (pFVIII)¹⁴⁶. Por outro lado, dados de um segundo estudo retrospectivo demonstraram que o risco de desenvolvimento de inibidores não foi substancialmente menor nos pacientes tratados com pFVIII comparados com aqueles que receberam rFVIII¹⁴⁷.

Trabalhos que avaliaram a influência da intensidade do tratamento no desenvolvimento de inibidores apresentaram resultados convergentes. Estudos retrospectivos demonstraram que a intensidade do tratamento foi implicada com o aumento de risco no desenvolvimento de inibidores¹⁴⁸. Da mesma forma, estudos que avaliaram o desenvolvimento de inibidores em pacientes com hemofilia A leve revelaram que a incidência de inibidores foi cerca de quatro vezes maior nos pacientes submetidos à terapia intensiva de reposição¹⁴⁹.

Embora a coexistência de doenças infecciosas e/ou imunizações em associação com a infusão de FVIII seja correlacionada com a ativação do sistema imune e influência no desenvolvimento de inibidores, estudos que avaliaram desafios do sistema imune no início da terapia de reposição não demonstraram associação com maiores incidências de inibidores^{129,143}.

Além dos fatores já citados, procedimentos cirúrgicos também são considerados como fator de risco, considerando que a cirurgia induz um estado pró-inflamatório que aumenta a imunogenicidade do FVIII. Adicionalmente, pacientes com hemofilia A, quando submetidos a qualquer procedimento invasivo, necessitam de infusão intensiva de concentrado de FVIII. O somatório destas duas condições, estado pró-inflamatório e intensa exposição ao FVIII, durante o período peri e pós-operatório poderia propiciar a perda da tolerância imunológica. De modo similar, pacientes que sofreram traumas significativos, associados com grandes sangramentos e ou dano tecidual também exibem um estado pró-inflamatório. Estudos clínicos que têm avaliado o papel da cirurgia em pacientes com hemofilia A demonstram dados conflitantes. Um estudo retrospectivo demonstrou existência de pequena associação entre cirurgia e formação de inibidor¹⁴⁷, e, por outro lado, um estudo de caso controle, não observou esta associação¹⁴³.

Tabela 2. Fatores de riscos genéticos e ambientais que contribuem para a formação de inibidores.

Fatores genéticos	Fatores ambientais
História familiar de inibidores	Tipo de produto infundido
Imunogenótipos: IL-10	Cirurgia + exposição ao FVIII
Imunogenótipos: TNF α	Trauma + exposição ao FVIII
Imunogenótipos: CTLA-4	Idade no momento da 1ª exposição
Imunogenótipos: Haplótipos MHCII	Intensidade de exposição
Etnicidade	Processos Inflamatórios/infecciosos

IL, interleucina; TNF α fator de necrose tumoral; CTLA-4, antígeno 4 de linfócito citotóxico; MHCII, Complexo Maior de Histocompatibilidade de Classe II. (Dados compilados a partir de Astermark, 2006¹²⁹ e Chambost, 2010¹⁵⁰).


A erradicação dos inibidores ocorre através da indução de tolerância imunológica ou tratamento de imunotolerância (TIT), que é considerado o método de escolha para a erradicação de inibidores¹⁵¹. Este método envolve repetidas infusões de FVIII em dosagens e frequências variadas^{152,153}, dependendo do esquema a ser utilizado. A taxa de sucesso do TIT é cerca de 60%-90%. O TIT é extremamente dispendioso, podendo requerer vários anos de tratamento para se atingir a tolerância. Além disso, a questão do acesso venoso pode complicar o tratamento¹⁵⁴. O tipo de mutação em *F8* parece influenciar a eficácia da imunotolerância, tendo sido demonstrado que grandes deleções parecem reduzir a resposta ao tratamento¹⁵⁵.

Pacientes que desenvolveram inibidores ou pacientes em que a TIT não foi eficaz, dispõem de poucas opções de tratamento para o controle das hemorragias. Uma das opções, se o nível de inibidor no sangue circulante é baixo, é a infusão de grandes doses de FVIII, de tal modo que o inibidor seja titulado e que o FVIII remanescente possa exercer seu papel na coagulação. Entretanto, usualmente, observa-se que este efeito de saturação dos inibidores ocorre apenas por um período pequeno de tempo. Da mesma forma, esta opção de tratamento não é viável para pacientes que apresentam altos níveis de inibidores no sangue, uma vez que a infusão de mais FVIII ativaria imediata resposta anamnésica.

Outras duas opções para tratamento de hemorragias em pacientes com inibidor é o uso de FVII recombinante ativado (rFVIIa) que pode se complexar com

FT e promover a geração de trombina. Além deste, os agentes “bypassing”, tal como o concentrado de complexo protrombínico parcialmente ativado (CPPA) também são usados¹⁵⁶.

Em pacientes com hemofilia A leve/moderada e mutações de risco para desenvolvimento de inibidores, recomenda-se tratar os eventos hemorrágicos com desmopressina (1-deamino-8-D-arginina vasopressina ou DDAVP). Este análogo da vasopressina promove o aumento dos níveis plasmáticos do FVIII, do FvW e também do t-PA tanto em indivíduos normais quanto em pacientes com hemofilia leve¹⁵⁷.

O aumento dos níveis plasmáticos de FVIII promovido pela desmopressina é bloqueado pelo uso de propanolol, sugerindo o envolvimento de receptores  adrenérgicos. Se a desmopressina atua em nível de transcrição, tradução, secreção ou mesmo em sítios de estocagem é desconhecido, entretanto, considerando-se que sua ação ocorre dentro de trinta minutos e que a transcrição de um gene tão extenso como o *F8* leva mais de três horas, com base em uma taxa de quinze nucleotídeos por segundo, é provável que a ação da desmopressina ocorra em nível pós-traducional¹⁵⁸. Independente da exata elucidação do mecanismo e sítio de ação o uso desta droga minimiza as infusões de concentrado e, conseqüentemente o risco de desenvolvimento de inibidores¹⁵⁹.

1.7.1.6 Aspectos genéticos da hemofilia A

A hemofilia A é uma doença monogênica clássica com padrão de herança recessivo, ligada ao cromossomo X . Portanto, afeta quase exclusivamente homens e muito raramente mulheres. Os homens possuem um único alelo e as mulheres possuem dois alelos. Homens com um alelo defectivo (hemizigose) terão a doença, enquanto mulheres com um único alelo defectivo (heterozigose) serão portadoras (geralmente assintomáticas), com 50% de probabilidade de transmitir o alelo anormal ao seu filho(a) (Figura 8). Já as mulheres com ambos os alelos defectivos (homozigose) manifestarão a doença, embora esta situação seja muito rara^{160,161}

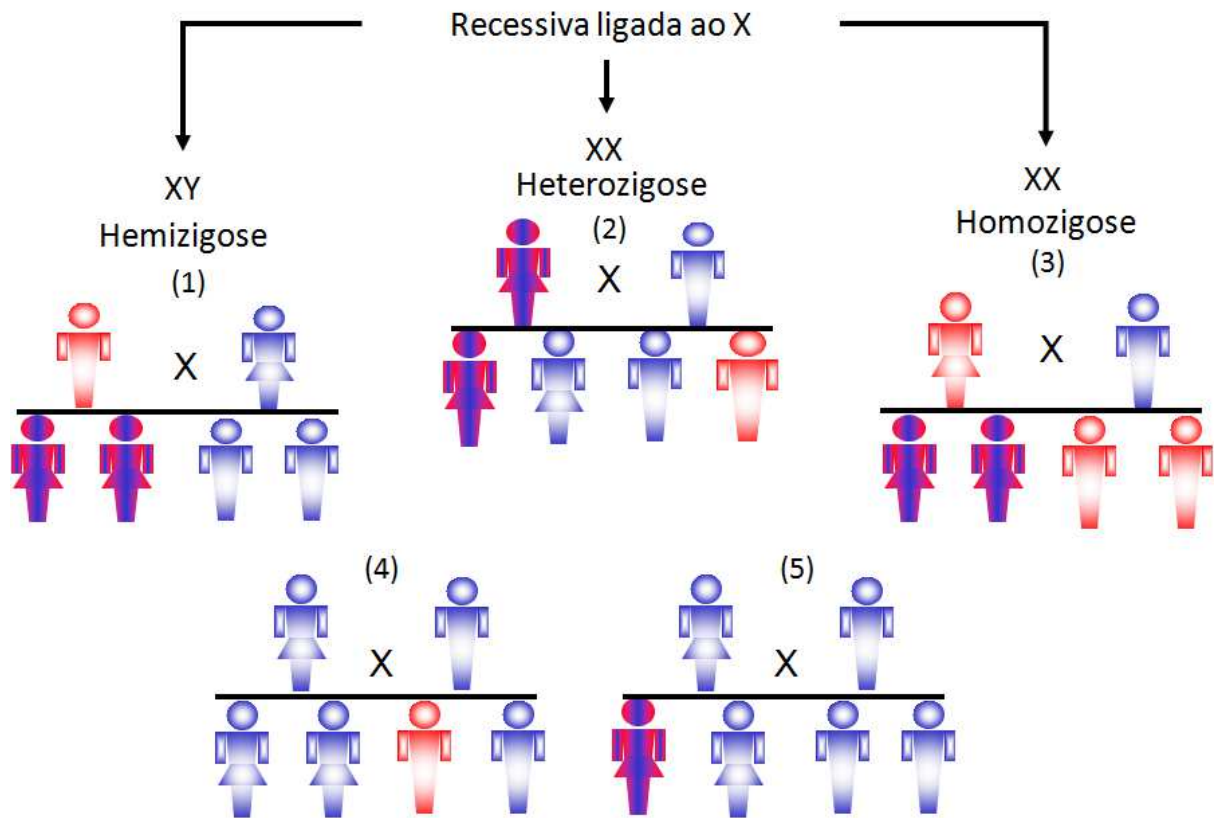


Figura 8. Representação do padrão de herança da hemofilia. (1) prole de um indivíduo com hemofilia com mulher normal; (2) prole de mulher portadora com indivíduo normal; (3) prole de mulher com hemofilia com indivíduo normal; (4) e (5) prole de um casal normal demonstrando a ocorrência de mutação de “novo” com nascimento um caso de hemofilia (4) ou de uma portadora (5) por ocorrência de moiascismo germinativo ou somático. Indivíduos em azul são normais (XX, XY), indivíduos em vermelho são afetados ($X^H Y$, $X^H X^H$) e indivíduos mesclados de vermelho e azul são portadores ($X^H X$). (Dados compilados a partir de Peyvandi et al., 2006¹⁶¹).

Assim como as demais doenças recessivas ligadas ao X, a taxa de mutação em hemofilia é alta ($4,2 \times 10^{-5}$) e a permanência da doença na população resulta do equilíbrio entre a perda de genes afetados e o ganho de novas mutações¹⁶². Além disso, estudos de casos esporádicos de hemofilia A demonstraram que a taxa de mutação é ainda dependente do tipo de mutação. A inversão do íntron 22 ocorre cerca de 15 vezes mais em células masculinas que femininas. Da mesma forma, Mutações pontuais originam-se cerca de cinco vezes mais em células germinativas masculinas. Especula-se que esse efeito resulte da metilação dos gametas, mas também do alto número de células em divisão durante a espermatogênese comparada à ovogênese. Em contraste, deleções dentro do gene do FVIII ocorrem mais frequentemente em células germinativas femininas. Neste caso, as deleções são explicadas por erros de recombinação, favorecidos pelo pareamento homólogo

dos cromossomos X¹⁶³. Este cenário explica a heterogeneidade alélica, o alto percentual de casos esporádicos e a variabilidade de mutações independentes em famílias distintas¹⁶⁴.

Desta forma, cerca de um terço dos casos de hemofilia recém diagnosticados não possuem história familiar prévia da doença¹⁶⁵. Estes casos são explicados pela ocorrência de alterações espontâneas que podem ocorrer em duas situações: (1) durante a gametogênese de um dos progenitores. Neste caso a alteração genética ocorre em uma das células da linhagem germinativa e persiste em todos os descendentes clonais da mesma e em uma proporção dos gametas. Esta situação caracteriza o mosaicismo germinativo ou gonadal (Figura 9) e (2) durante os primeiros estágios da embriogênese. Neste caso, a alteração genética ocorre em uma das células presentes nos estágios iniciais do embrião em formação e a mesma é repassada às demais células por meio de mitoses sucessivas. O resultado destas alterações pós-zigóticas é a coexistência de células normais e alteradas no mesmo indivíduo, normalmente referidas como mosaicismo somático, entretanto os mosaicos podem ser germinativos e/ou somáticos dependendo do quanto precoce foi a alteração genética e da linhagem celular envolvida¹⁶⁶⁻¹⁶⁸ (Figura 10).

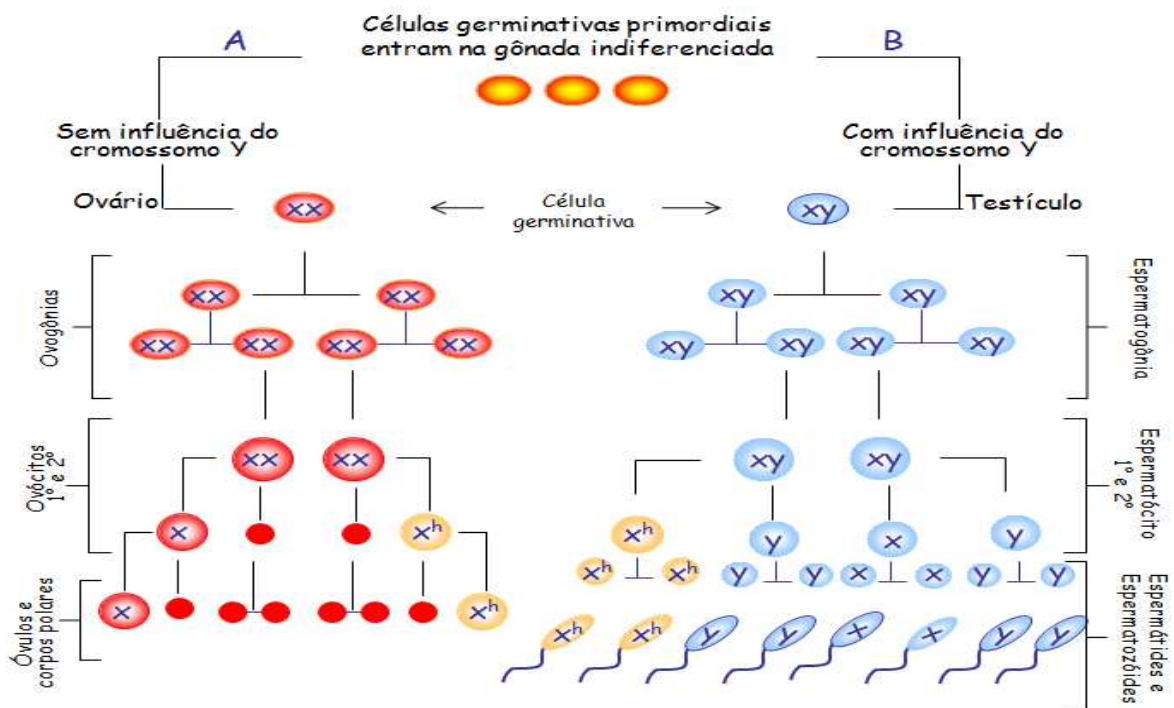


Figura 9. Representação esquemática do mosaicismo germinativo em hemofilia A. A, ovogênese demonstrando a ocorrência de mutação na segunda divisão meiótica, B, espermatogênese demonstrando a ocorrência de mutação na segunda divisão meiótica. (Dados compilados a partir de Leuer, 2001¹⁶⁶ e Kasper, 2007¹⁶⁷)

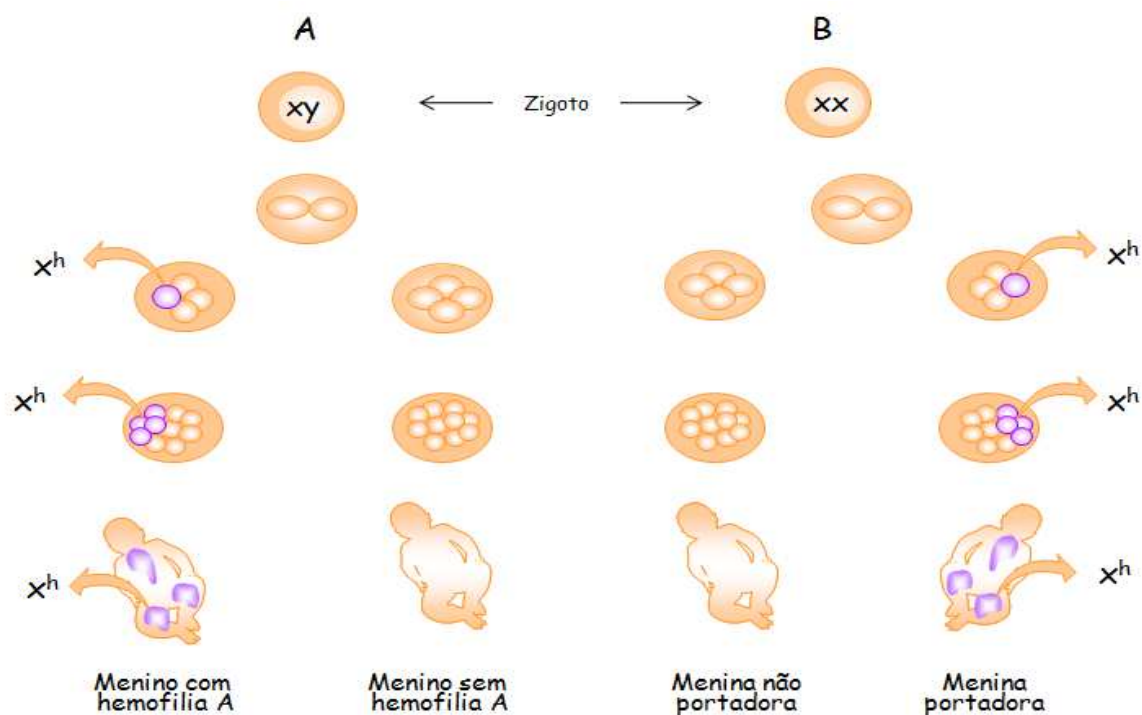


Figura 10: Representação esquemática do mosaicismosomático em hemofilia. A) embriogênese de criança do sexo masculino, B) embriogênese de criança do sexo feminino. Em ambos os casos é demonstrada a ocorrência de mutação nos estágios iniciais da embriogênese. (Dados compilados a partir de Leuer, 2001¹⁶⁶ e Kasper, 2009¹⁶⁹)

1.7.1.7 Aspectos moleculares da hemofilia A

1.7.1.7.1 O gene do FVIII

O *F8* foi mapeado e encontra-se localizado na extremidade do braço longo do cromossomo X (Xq28), mais precisamente, a partir do par de bases (pb) 153.717.259 até o pb 153.904.191 (seqRef. NT_167198.1). Compreende 186.933 pb distribuídos em 26 éxons e 25 íntrons que variam de 69 a 3106 pb e de 0,2 a 32,4 kilobases (kb), respectivamente. Toda a sequência do gene compreende aproximadamente 9 kb de éxons e 177 kb de íntrons, que, juntos correspondem aproximadamente 0,1% de todo o cromossomo X¹⁷⁰ (Tabela 3) (Figura 11).

Tabela 3. Tamanho dos éxons e íntrons do gene do FVIII.

Éxon	Tamanho (pb)	Íntron	Tamanho (pb)
1	344	1	22.808
2	122	2	2.383

3	123	3	3.824
4	213	4	5.630
5	69	5	2.433
6	117	6	15.134
7	222	7	2.643
8	262	8	284
9	172	9	4.801
10	94	10	3.903
11	215	11	2.914
12	151	12	5.984
13	210	13	16021
14	3.106	14	21.997
15	154	15	1.393
16	213	16	286
17	229	17	207
18	183	18	1.738
19	117	19	608
20	72	20	1.419
21	86	21	3.633
22	156	22	32.849
23	145	23	1.216
24	149	24	1.109
25	177	25	22.679
26	1.958	---	

Dados compilados a partir de informações disponíveis em: <http://www.ensembl.org/index.html>¹⁷⁰. pb, par(es) de base.

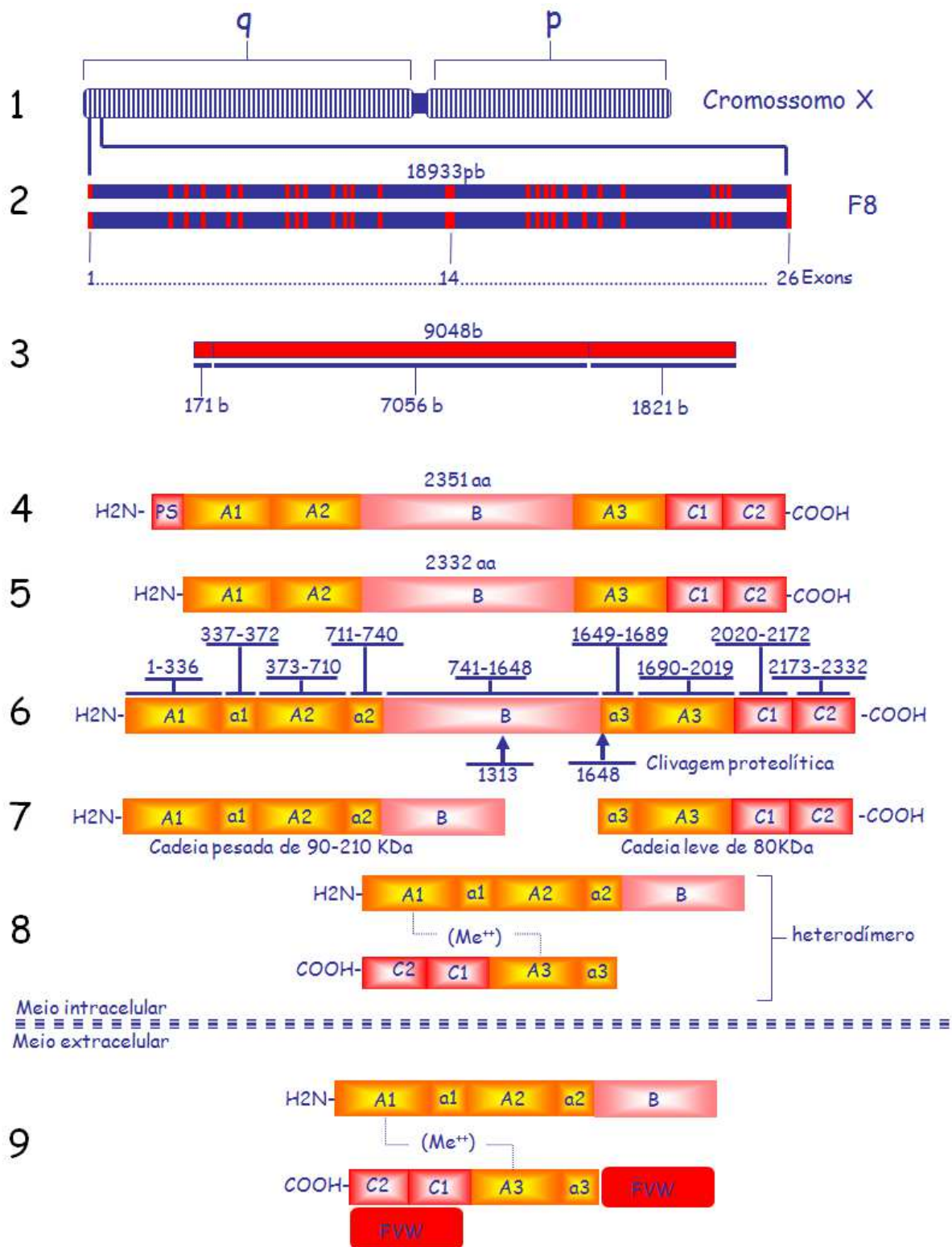


Figura 11. Representação esquemática da organização estrutural de *F8* e FVIII. 1) cromossomo X com braços p e q; 2) *F8* com representação dos éxons (em vermelho) e íntrons (em azul); 3) mRNA de *F8*; 4) Estrutura precursora do FVIII, 5) estrutura primária do FVIII, 6) detalhamento dos domínios quanto ao número de resíduos de aminoácidos e sítios de clivagem; 7), FVIII após a clivagem exibindo a cadeia leve e pesada; 8) FVIII na forma de heterodímero; 9) FVIII complexado ao FvW. b, bases; pb, pares de bases; PS, peptídeo sinal; aa, aminoácidos; A1,A2, A3,B, C1 e C2 identificam os domínios, a1, a2 e a3 identificam as regiões ácidas, KDa, kilodaltons; Me⁺⁺, metal bivalente; FvW, Fator de Von Willebrand. (Dados compilados a partir de Lenting et. al., 1998¹⁷¹, Graw et al, 2005¹⁰⁰).

Até o presente, ainda existe pouco conhecimento sobre a regulação transcricional de *F8*. Entretanto, sabe-se que intracelularmente, o transporte do mRNA do FVIII do núcleo para o citoplasma é bastante pobre e que existem regiões dentro da sequência codificadora do FVIII que atuam como inibidores transcricionais ou mesmo como sequências silenciadoras^{172,173}.

A análise da região promotora revelou a presença de “Cis-elementos” e de fatores transcricionais envolvidos na regulação da transcrição de *F8*. Sabe-se que uma sequência de -1.175 a -9 anteriores à extremidade 5’ apresenta dezenove sítios para ligação a fatores de transcrição, designados de A - S. Dentro desta sequência, a região de -300 a -50 inclui os sítios A, B, C, D, e E necessários para a máxima expressão do gene. Nestes sítios interagem quatro fatores específicos do fígado e um fator ubíquo: Fator 1 nuclear do hepatócito (HNF-1) no sítio A, Fator nuclear Kappa B (NF κ B) no sítio B, Proteína Estimuladora de ligação Alfa e Beta (C/EBP α/β) na região proximal e distal dos sítios C e D e o Fator 4 nuclear do hepatócito (HNF4) no sítio E¹⁷⁴.

Adicionalmente, encontra-se uma sequência GATAA localizada a -200, que demonstrou não ser essencial para a atividade promotora e o sítio inicial de transcrição localizado a -170 (o ponto +1 refere-se ao sítio inicial de tradução), implicando que o gene tem uma longa extremidade 5’ não traduzida. A região que flanqueia a extremidade 3’ apresenta o sinal de poliadenilação¹⁷⁵ (Figura 12).

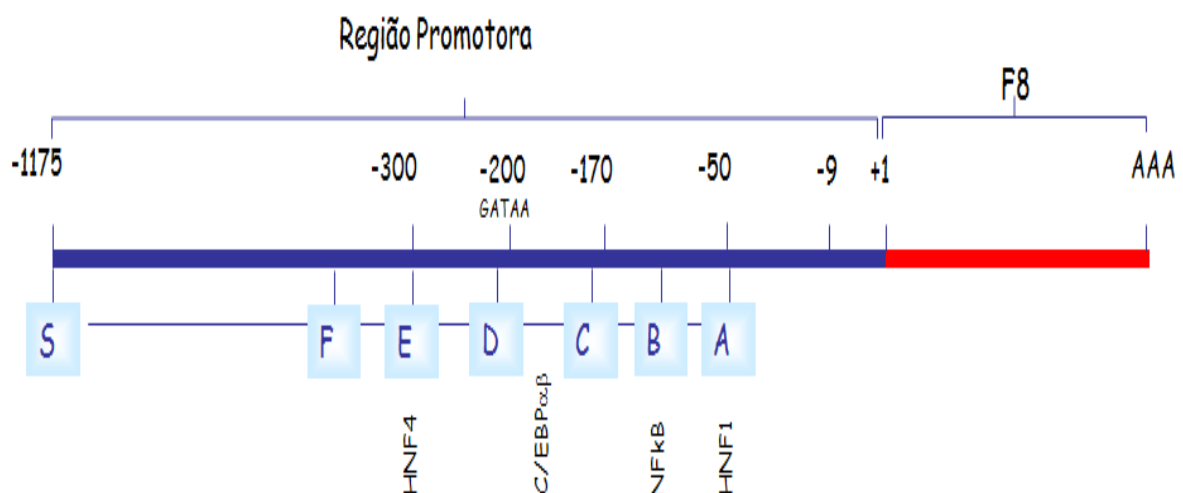


Figura 12. Representação esquemática da região promotora do gene do FVIII: detalhamento da região -1175 até -9 anterior à extremidade 5’ do gene do FVIII. Sítios para ligação de fatores de transcrição (A até S), sendo que a região entre -300 e -50 é responsável pela máxima expressão do produto do gene. Fatores transcricionais (HNF1, Nf κ B, C/EBP α/β e HNF4) interagem com estes sítios. (Dados compilados a partir de Figueiredo et al., 1995¹⁷⁴ e McGlynn et al., 1996¹⁷⁵).

Algumas características de *F8* devem ser enfatizadas: a presença de cerca de 70 ilhas de CpG, das quais 2% estão em seqüências codificadoras; o grande tamanho do éxon 14 (3106 pb) que representa cerca de 40% da região codificadora, mas que codifica a parte funcionalmente menos importante da proteína, o domínio B (Figura 11) e o grande tamanho do íntron 22 que apresenta uma ilha de CpG que funciona como promotor bidirecional para dois transcritos adicionais denominados *F8A* e *F8B*. O *F8A* possui 1,8 kb, não apresenta íntrons e é transcrito em direção oposta a *F8*. Já *F8B* possui 2,5 kb e é transcrito na mesma direção de *F8*, sendo parcialmente sobreposto ao mesmo (éxons 23 - 26 de *F8*). As seqüências de *F8A* e da ilha de CpG formam uma região de aproximadamente 9,5 kb denominada *inth22h-1*. Essa região possui duas cópias homólogas (*inth22h-2* e *inth22h-3*) localizadas aproximadamente a 400 kb, na porção telomérica do cromossomo X⁸⁴ (Figura 13).

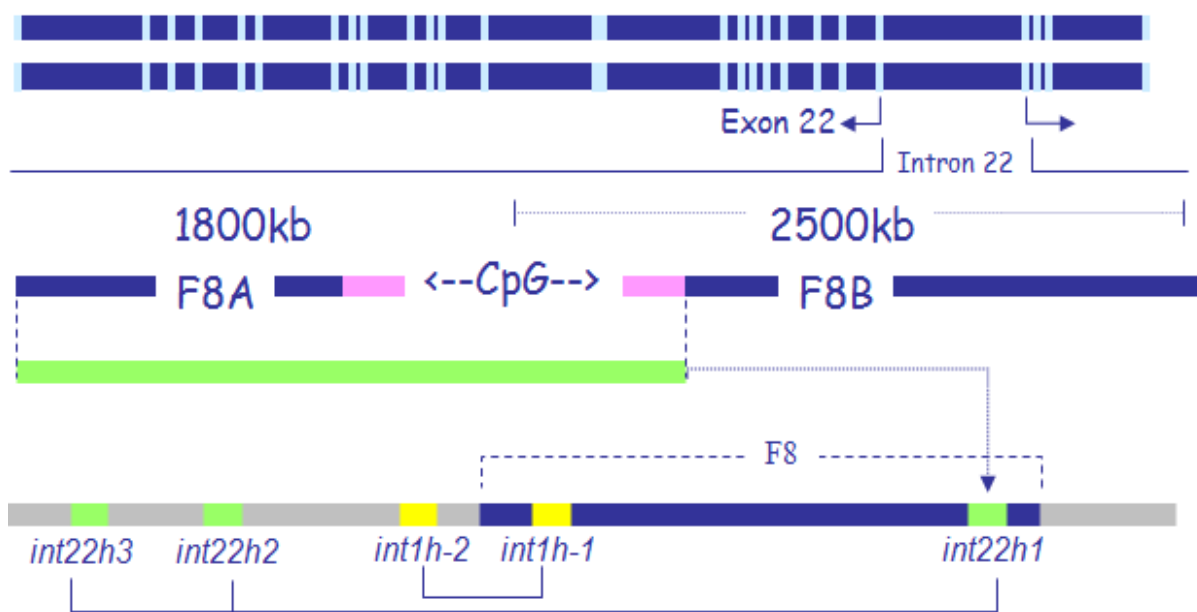


Figura 13. Representação esquemática da região do íntron 22 do gene do FVIII. A) detalhamento da região do íntron 22, mostrando ilha de CpG e as regiões correspondentes aos transcritos adicionais *F8A* e *F8B*; B) seqüências homólogas presentes dentro e fora de *F8* estão identificadas e sinalizadas em verde (*inth22-h*) e amarelo (*int1h*) (externas a *F8*). (Dados compilados a partir de Bowen, 2002⁸⁴).

Existe uma segunda região homóloga envolvendo seqüência intra e extragênica em *F8*. Esta região, de aproximadamente 1 kb presente no íntron 1, denominada *int1h1*, possui uma região homóloga extra-gênica localizada a aproximadamente 140kb, na porção telomérica do cromossomo X. Essa cópia

extragênica é denominada *int1h2*. Estas regiões de alta homologia funcionam como sítios de recombinação homóloga e determinam rearranjos intragênicos cuja importância será situada mais adiante^{176,89}.

Outra característica importante de *F8* é seu baixo número de polimorfismos. Em recente apresentação da sequência do genoma humano, dois genomas haplóides escolhidos aleatoriamente apresentaram em média a diferença de 1 base/1250 bases¹⁷⁷.

Com esta relação, o número de polimorfismos esperado para *F8* seria de aproximadamente 144. Entretanto, este número é considerado superior se comparado ao número de polimorfismos detectados até então. Os polimorfismos observados em *F8* são de dois tipos: SNPs (polimorfismo de base única) e VNTRs (sequências de número variável de repetições em tandem). Essas variações têm relevância clínica no contexto de desordens hereditárias, uma vez que podem ser usadas para rastrear um gene defeitivo em uma família afetada. Entretanto, devem-se levar em consideração as diferenças nas frequências de alelos entre populações distintas, pois *loci* de grande interesse diagnóstico podem diferir de acordo com a etnia da população, assim como o desequilíbrio de ligação⁸⁵.

1.7.1.7.2 O transcrito do gene do FVIII - RNA mensageiro

Em humanos, o sítio primário de expressão do FVIII é o fígado, mais precisamente os hepatócitos. Entretanto, o RNA mensageiro para o FVIII já foi detectado em outros tecidos, incluindo baço, rim, nódulos linfáticos e placenta¹⁷⁸.

O transcrito de *F8* tem 9048 bases e compreende uma curta região 5' não traduzida (171 bases), uma fase de leitura aberta (7056 bases) e uma longa extremidade 3' (1821 bases) não traduzida¹⁷⁹ (Figura 11).

1.7.1.7.3 A proteína FVIII

O FVIII é traduzido como uma proteína precursora de cadeia única contendo 2.351 resíduos de aminoácidos. Durante o processo de translocação pelo retículo endoplasmático, os 19 resíduos de aminoácidos, referentes ao peptídeo sinal são removidos, resultando em uma proteína madura de 2.332 resíduos de aminoácidos¹⁸⁰. A estrutura primária do FVIII é constituída de uma proteína precursora de cadeia única com aproximadamente 300 KDa (kiloDalton)¹⁸¹. A

análise da estrutura primária do FVIII mostrou que os 2332 resíduos desta glicoproteína são organizados na forma de domínios distintos representados pela estrutura NH₂-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH¹⁸²(Figura 11).

Os domínios “A” são interconectados por curtas sequências espaçadoras denominadas a1, a2 e a3, constituídas por aglomerados de resíduos de Aspartato (Asp) e glutamato (Glu). A região ácida a1 conecta o domínios A1 ao domínio A2, a região ácida a2 conecta o domínios A2 ao domínio B e a região ácida a3 conecta o domínio B ao domínio A3¹⁸³. Os três domínios “A” possuem aproximadamente 30% de homologia entre si e, além disso, apresentam homologia com seqüências dos domínios “A” do FV e com domínios “A” da ceruloplasmina^{184,185}.

O domínio B não exibe nenhuma homologia significativa com qualquer outra proteína conhecida e parece ser dispensável para a atividade coagulante *in vitro*, pois a deleção do domínio B resulta em uma molécula cuja atividade de cofator é absolutamente normal^{186,171}. O domínio B é constituído por 908 resíduos de aminoácidos codificados pelo grande éxon 14. Além disso, é altamente glicosilado, contendo 19 dos 25 potenciais sítios de N-glicosilação. Embora sua função seja desconhecida, estudos mais recentes têm mostrado que este domínio desempenha um papel principal no processamento e tráfico intracelular^{187,188}.

Os domínios C1 e C2 estão localizados na região C-terminal da cadeia leve do FVIII e também são estruturalmente relacionados entre si. Além disso, estes domínios apresentam homologia com seqüências do domínio C do FV, e mostram similaridades com famílias de proteínas semelhantes à discoidina (família de proteínas que expressam propriedades de ligação a fosfolípides)^{189,190}.

São ainda relatadas similaridades estruturais com seqüências da proteína de membrana de glândulas mamárias de humanos e camundongos¹⁹¹, com seqüências de uma molécula de adesão de célula neuronal encontrada em *Xenopus laevis*¹⁹² e com seqüências de um receptor de tirosina-quinase encontrada em carcinoma de estômago¹⁹³.

Por fim, a comparação de seqüências do FVIII de humanos, murinos, caninos e suínos revelou alto grau de homologia entre as quatro espécies, exceto para o domínio B que é menos conservado. A maturação e a secreção do FVIII recém-sintetizado envolvem várias interações proteína-proteína e diversas modificações pós-traducionais¹⁹⁴.

Ainda no retículo endoplasmático, a proteína recém sintetizada sofre intensas modificações pós-traducionais, incluindo a adição de oligosacarídeos e a formação

de ligações de dissulfeto. Uma imunoglobulina do tipo chaperona, proteína de ligação a imunoglobulina (BIP), nativa do lúmem do retículo endoplasmático, liga-se a uma significativa porção do FVIII e sua liberação está condicionada a altos níveis intracelulares de ATP e à atividade de AtPase da BIP. O FV, estruturalmente homólogo ao FVIII é altamente glicosilado, mas não é capaz de se ligar a BIP e é secretado em níveis de 5-10 vezes mais elevados¹⁹⁵.

Duas outras chaperonas localizadas no lúmem do retículo endoplasmático foram recém caracterizadas, a calnexina e calreticulina. Estas proteínas associam-se transitoriamente a glicoproteínas solúveis e de membrana durante o dobramento e montagem das subunidades das proteínas. Sabe-se que a calreticulina interage tanto com o FVIII quanto com o FV. Entretanto, a calnexina interage com o FVIII, mas não com o FV¹⁹⁶. Estes achados podem esclarecer quanto ao papel do domínio B do FVIII, que, devido ao elevado nível de N-glicosilação permite uma eficiente interação da calnexina e determina um efeito positivo na secreção de FVIII para o espaço extracelular^{197,198}.

A clonagem posicional de um gene responsável pela deficiência combinada de FVIII e FV permitiu a identificação de uma proteína importante para a eficiência da secreção do FVIII. Mutações no gene *ERGIC-53* determinam níveis reduzidos em 5-30% do valor normal, tanto de FV quanto de FVIII. A proteína ERGIC-53 é encontrada em um compartimento intermediário do retículo endoplasmático e tem um importante papel no transporte de um seletivo grupo de glicoproteínas por meio de uma via de secreção^{199,200}.

Após o processamento no retículo endoplasmático, o FVIII é encaminhado para o aparato de Golgi. Dentro deste, o FVIII é clivado por proteases que atuam em sítios específicos do domínio B (Arg¹³¹¹ / Ala¹³¹⁴; Arg¹⁶⁴⁸ / Glu¹⁶⁴⁹). Estas clivagens dividem a molécula de FVIII em duas porções: a cadeia pesada N-terminal de 210 kDa constituída pelo domínio A1, A2 e fragmentos heterogêneos do domínio B e a cadeia leve C-terminal de 80 kDa, constituída pelos domínios A3, C1 e C2. Além das clivagens proteolíticas, ocorre ainda no aparato de Golgi, a sulfatação de seis resíduos específicos de tirosina da cadeia leve e da cadeia pesada e a adição de oligossacarídeos (galactose, fucose e ácido siálico), resultando na secreção de um heterodímero dependente de metais bivalentes, especialmente o cálcio²⁰¹.

Na circulação, o FVIII circula na forma de um heterodímero é complexado ao FvW na proporção de uma molécula de FVIII para cada cinquenta monômeros de F vW. O FvW atua como carreador do FVIII durante sua secreção e circulação no

plasma. A interação entre estas duas proteínas ocorre através de sítios específicos: 272 resíduos de aminoácidos da região amino-terminal do FvW e a cadeia leve do FVIII. Além destes são também importantes para a interação, um grupo de resíduos de aminoácidos presentes na porção N-terminal do domínio A3 do FVIII (Glu¹⁶⁴⁹/Ala¹⁶⁸⁹), a sulfatação do resíduo de Tyr¹⁶⁸⁰, que parece ser crítico para a alta afinidade entre FVIII e FvW e regiões do domínio C2 (resíduos 2303-2332). A meia-vida do FVIII no plasma quando associado ao FvW é de 12 a 15 horas. Entretanto, o FVIII não complexado tem uma meia vida estimada de apenas 37-160 minutos. A interação do FVIII com o FvW protege o FVIII da inativação protéica pela PC ativada, da clivagem do FXa e inibe a ligação do FVIII a FL e a plaquetas ativadas²⁰².

1.7.1.7.4 O papel fisiológico do FVIII

O FVIII humano é uma glicoproteína não enzimática que se encontra dispersa no plasma e desempenha um papel fundamental no processo de coagulação. Neste, o FVIII é ativado pela trombina e pelo FX. Ambas as proteases clivam a molécula de FVIII nas posições Arg³⁷² e Arg⁷⁴⁰ da cadeia pesada e Arg¹⁶⁸⁹ da cadeia leve. Estas clivagens resultam em dois fragmentos A1-A2 e A3-C1-C2 que permanecem associados por meio de interações eletrostáticas entre o domínio A1 e A3. A ativação do FVIII reduz drasticamente sua afinidade com o FvW e leva a uma rápida dissociação do complexo²⁰³.

Após a dissociação, o FVIII adquire alta afinidade para fosfolípidos de membrana e incorpora-se ao complexo tenase que, por sua vez, atua enzimaticamente sobre o FX convertendo-o para sua forma ativada. O FXa participa da conversão da protrombina em trombina, que converterá fibrinogênio em fibrina. Uma vez que o FVIIIa tenha desempenhado seu papel na cascata da coagulação, ele é rapidamente inativado. O mecanismo exato desta inativação em condições fisiológicas ainda é desconhecido. Entretanto, a PC ativada cliva a cadeia pesada do FVIIIa nas posições Arg³³⁶/Met³³⁷ e Arg⁵⁶²/Gly⁵⁶³ em uma reação que requer a PS e a região carboxi-terminal do domínio B do FV²⁰⁴.

1.7.1.8 As bases moleculares da hemofilia A

Nos últimos anos, devido ao progresso nas áreas da biologia e bioquímica, ocorreram grandes avanços no entendimento da hemofilia A, em especial de suas

bases moleculares. A clonagem do *F8* em 1984²⁰⁵ e o advento das técnicas de PCR (“polymerase chain reaction”)²⁰⁶ e sequenciamento no final dos anos 80²⁰⁷, permitiram a identificação dos defeitos moleculares em grande parte dos pacientes com hemofilia dos países desenvolvidos. Em consequência, inúmeras mutações associadas à doença foram descritas. Alguns bancos de dados reúnem informações a respeito dos defeitos moleculares na hemofilia A, dentre eles o HADB²⁰⁸ – “Hemophilia A Mutation Data Base and Factor VIII resource Site” e o HGMD²⁰⁹ – “The human Mutation Data Base”. Os dados moleculares compilados sobre a hemofilia A comprovam a grande heterogeneidade de alterações genéticas associada à doença (Tabela 4).

Tabela 4. Resumo das alterações genéticas compiladas em bancos de dados

ALTERAÇÃO GENÉTICA (tipo de mutação ou região)	BANCO DE DADO	
	HADB	HGMD
Mutação sem sentido /sentido trocado	714(58,4%)	1218(60%)
Mutação em sítio de processamento	95(7,7%)	140(6,8%)
Mutação em região promotora	NR	4(0,2%)
Pequenas deleções	197(16,1%)	325(16%)
Pequenas inserções	80(6,5%)	96(4,7%)
Inserções+deleções	NR	24(1,8%)
Grandes deleções	135(11%)	189(9,3%)
Grandes inserções	NR	21(1,0)
Rearranjos complexos	NR	12(0,6%)
TOTAL	1221	2029

Dados compilados a partir de <http://hadb.org.uk>²⁰⁸ e <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac>²⁰⁹. NR, não registrado.

O HADB, o maior banco de dados sobre hemofilia de livre acesso, disponibiliza a listagem de alterações genéticas publicadas, dados fenotípicos, modelos moleculares, métodos para o rastreamento de mutações, lista de polimorfismos e uma revisão sobre a patologia molecular da doença. Este banco de dados lista atualmente 1.221 alterações genéticas associadas à hemofilia A

envolvendo substituições, deleções e inserções distribuídas pelo gene. Já o banco de dados HGMD, um banco privado, de acesso parcialmente livre e que conta com atualizações trimestrais, lista atualmente 2029 alterações genéticas associadas à hemofilia A. Dentre as alterações genéticas relacionadas à hemofilia A, as alterações de sentido trocado e as alterações sem sentido são as mais representativas, seguidas das deleções e das inserções^{208,209}.

Ainda com relação às alterações genéticas, dois rearranjos cromossômicos específicos são relevantes, a inversão do íntron 22 e a inversão do íntron 1, uma vez que são prevalentes em casos de hemofilia A grave. Ambos os rearranjos impedem a formação completa do mRNA do *F8* e, conseqüentemente, resultam na ausência da proteína, o que conduz à hemofilia A grave²¹⁰.

1.7.1.8.1 Inversão do íntron 22

A inversão do íntron 22 resulta da recombinação homóloga entre a sequência *int22h1* e uma das cópias extragênicas (*int22h2* ou *int22h3*) localizadas a 400-500 kb na porção telomérica do cromossomo X. A propensão a este evento de recombinação deve-se à homologia observada entre essas sequências, que é superior a 99%. Dependendo da cópia extragênica envolvida no evento de recombinação, dois tipos principais de inversão são reconhecidos. A inversão do tipo 1 envolve a cópia distal (*int22h3*) e a inversão do tipo 2 envolve a cópia proximal (*int22h2*) (Figura 14). Esta inversão ocorre quase exclusivamente na meiose masculina e este fato é explicado pela ausência do segundo cromossomo X, fato que facilita o processo de inversão durante a meiose. Estudos desta população normalmente demonstram frequências em torno de 45% dos casos graves de hemofilia, entretanto variações nesta prevalência têm sido observadas em alguns países^{211,212} (Tabela 5).

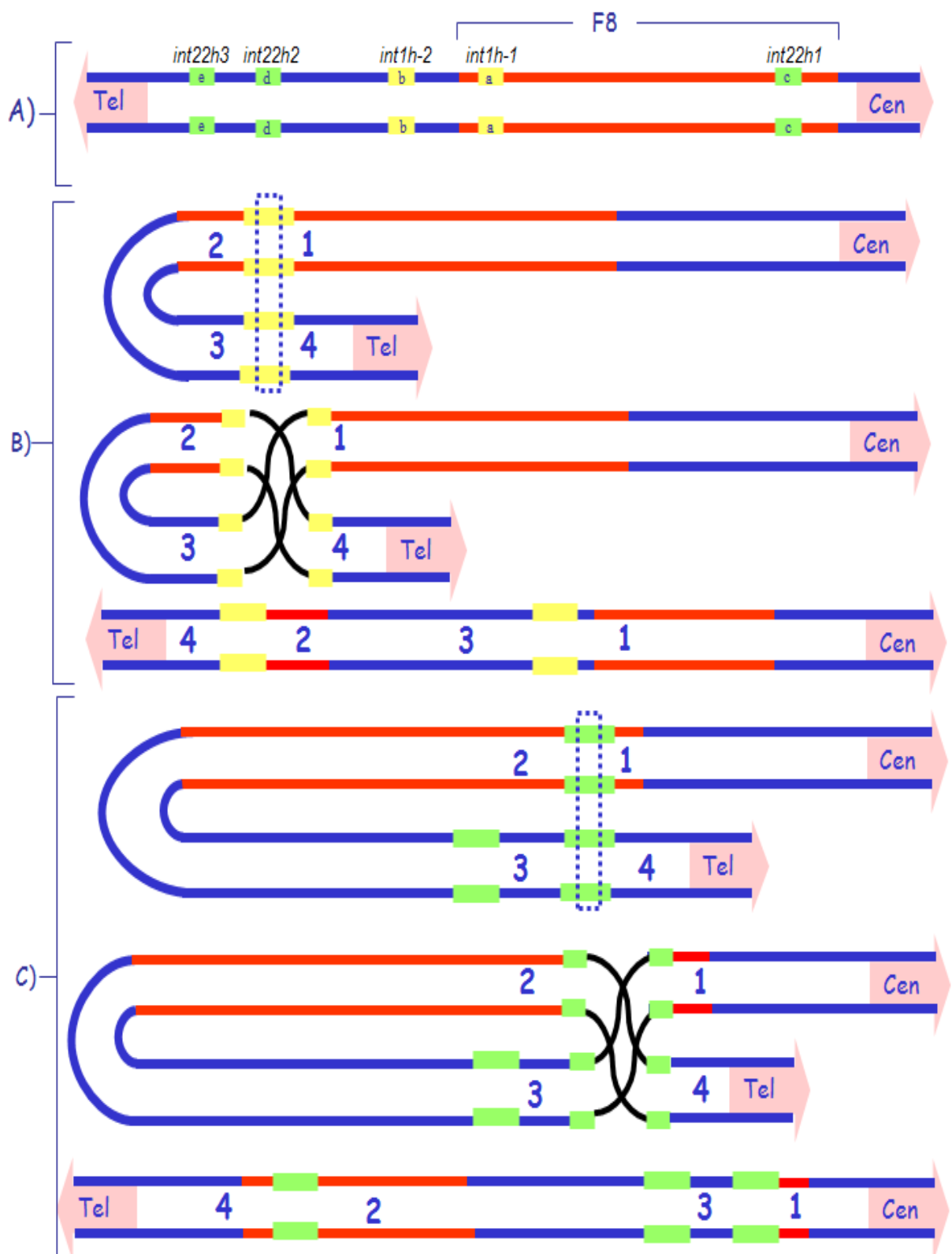


Figura 14. Representação esquemática das inversões dos íntrons 1 e 22 de *F8*. A, representação esquemática de *F8* juntamente com a porção telomérica do cromossomo X, “a” e “b” (barras amarelas) representam as cópias homólogas *int1h-1* e *int1h-2*, respectivamente; “c”, “d”, e “e” representam as cópias homólogas *int22h-1*, *int22h-2* e *int22h-3*, respectivamente. B, representação esquemática da inversão do íntron 1. C, representação esquemática da inversão do íntron 22 do tipo 1. Tel, telômero; Cen, centrômero. (Dados compilados a partir de Lakich et al, 1993²¹¹ e Bagnall et al., 2002²¹³).

Inicialmente, postulou-se que regiões *int22h-2* e *int22h-3* tivessem a mesma orientação, as duas contrárias a *int22h-1* considerando que ambas participavam dos eventos de recombinação²¹⁴. Novos dados de sequenciamento do cromossomo X humano comprovaram que *int22h-1* e *int22h-2* têm a mesma orientação, mas *int22h-3* tem orientação oposta em relação a *int22h-1* e *int22h-2*. As regiões *int22h-1* e *int22h-2* formam a parte interna dos braços de um palíndromo imperfeito com um *loop* central único de 67,3 kb e braços de 50,5 kb, onde *int22h-2*, fica no braço centromérico. Considerando a disposição das cópias acima no cromossomo X, a ocorrência de inversão de *int22h-1* com *int22h-2*, ocorreria mediante recombinação intracromossomal entre *int22h-2* e *int22h-3*, de modo que as cópias extragênicas invertessem de posição. Assim, *int22h-2* estaria inversamente orientado em relação a *int22h-1*, favorecendo a inversão entre essas duas regiões. A necessidade de ocorrência de dois eventos de recombinação é condizente com o fato da inversão do tipo 2 ser cinco vezes mais rara que a inversão do tipo 1²¹⁵.

1.7.1.8.2 Inversão do íntron 1

A inversão do íntron 1 envolve a recombinação homóloga entre uma região de 1.041 pb situada no íntron 1 (*int1h1*) e uma região extragênica (*int1h2*) situada a aproximadamente a 140 kb na porção telomérica do cromossomo X, entre os genes *BRCC3* (BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 3) e *VBP1* (von Hippel-Lindau binding protein 1). Apesar da inversão, é observada a transcrição de dois mRNAs quiméricos. Um deles, sob o controle do promotor de *F8* e o outro sob o controle do promotor do gene *BRCC3*. A similaridade entre *int1h1* e *int1h2* é muito alta, sendo observada a diferença de um único nucleotídeo entre elas^{176,213}. A prevalência da inversão do íntron 1 é variável de acordo com a população estudada²¹⁶. (Tabela 5).

Tabela 5: Estudos representativos da inversão do íntron 1 e íntron 22 em casos de hemofilia A grave.

População	Nº casos	Inversão Íntron 22	Frequência %	Inversão Íntron 1	Frequência %	Ref.
Europa						
Albania	19	2	10,5	0	0	217
Bulgaria	40	19	47,5	0	0	218
Rep. Tcheca	162	-	-	7	4,3	219
Eslováquia	44	22	50,0	-	-	220

França	241	NA	46,0	NA	1,0	221
França	120	21	46,0	0	0	222
Alemanha	1127	-	-	23	2,0	223
Alemanha	753	NA	47,5	NA	5,0	128
Hungria	104	54	51,9	0	0	224
Itália	293	-	-	5	1,7	225
Itália	20	-	-	4	5,0	226
Itália	874	451	52,0	19	2,0	227
Itália	93	39	42,0	3	3,2	228
Macedônia	55	23	41,8	4	7,3	218
Portugal	135	73	54,0	2	1,5	229
Eslovênia	39	19	48,7	-	-	230
Espanha	102	42	41,2	-	-	231
Espanha	79	-	-	4	5,0	232
Espanha	99	NI	52,5	NI	3,0	233
Reino Unido	209	94	45,0	10	4,8	213
Reino Unido	595	-	-	11	1,9	234
Reino Unido	51	8	15,6	3	5,9	235
Asia						
Anatolia	61	-	-	0	0	236
Índia	80	35	43,8	3	3,8	237
Iran	124	49	39,5	2	1,5	238
Japão	100	42	42,0	-	-	239
Turquia	141	41	29,0	-	-	240
América Latina						
Argentina	80	36	45,0	1	1,3	241
Brasil	49	24	49,0	-	-	242
Brasil	33	13	39,4	-	-	243
Brasil	107	43	46,0	3	3,0	216
Brasil	122	-	-	8	4,1	(*)
México	31	14	45,2	0	0	210
Oceania						
Nova Zelândia	26	14	54,0	3	11,0	244

(*) presente estudo.

1.7.1.8.3 Outras interações genéticas

Apesar do grande volume de informações sobre as bases moleculares da hemofilia A, existe um percentual de cerca de 2% dos pacientes cujo diagnóstico molecular não é estabelecido, mesmo usando as abordagens mais avançadas para a análise do gene. Isto pode ser decorrente de mutações que estão presentes em regiões não codificadoras ou ser decorrente de pacientes que não possuem

mutação associada ao *F8*^{245,246}. É possível que haja participação de outros genes como, por exemplo, no caso dos genes *LMAN1* (“lectin, manose binding 1”, também conhecida como *ERGIC53*) e *MCFD2* (“multiple coagulation factor deficiency 2 protein”) responsáveis pelo transporte intracelular do FVIII do retículo endoplasmático para o aparato de Golgi. Defeitos destas proteínas resultam em deficiência combinada de FV e FVIII da coagulação²⁴⁷.

Diversas proteínas interagem com o FVIII na circulação. Uma das mais importantes é o FvW. O FvW é uma glicoproteína multimérica que desempenha duas principais funções na hemostasia: (1) ela participa da hemostasia primária quando atua como um mediador para a interação entre as glicoproteínas da superfície plaquetária e a parede do endotélio, no sítio de injúria vascular e, (2) participa da hemostasia secundária quando atua como proteína carreadora do FVIII, aumentando sua meia vida²⁴⁸.

Considerando sua função na hemostasia secundária, é fácil compreender que a deficiência do FvW resulta em uma correspondente diminuição dos níveis de FVIII e em quadros clínicos similares àqueles observados em pacientes com hemofilia A. Dos diversos subtipos clínicos (tipos 1, 2A, 2B, 2M, 2N) da DvW, o sub-tipo 2N é o único que decorre da redução da interação entre o FvW e o FVIII devido à mutações nos domínios D¹ ou D3 do FvW²⁴⁹. Homozigotos ou heterozigotos compostos, para essa condição, apresentam redução dos níveis de FVIII no plasma e podem eventualmente serem diagnosticados como casos de hemofilia A leve ou moderada. A análise desta variante é importante, sobretudo em pacientes cuja análise molecular para hemofilia A mostrou-se negativa para mutações em *F8*²⁵⁰.

Outra questão a ser pontuada quanto a mutações em outros genes diz respeito a fatores que podem influenciar o fenótipo da hemofilia. Trabalhos recentes mostraram que, pacientes que apresentam a mesma mutação e níveis residuais de FVIII similares, podem apresentar variações quanto ao padrão de manifestações hemorrágicas²⁵¹. Dentre as possíveis explicações para a variabilidade fenotípica observada em pacientes com hemofilia citam-se principalmente a coexistência de mutações protrombóticas, tais como o fator V de Leiden, mutações no gene da protrombina G20210A, no gene da metilenotetrahidrofolato redutase, a deficiência de PC e PS^{252,253}. Além destes, a co-herança de polimorfismos que afetam o sistema de coagulação também são reportados como moduladores da variação fenotípica relacionada à hemofilia²⁵⁴. Há ainda trabalhos recentes que associam a variabilidade

fenotípica a diferenças da farmacocinética do FVIII infundido nos pacientes. Estes fatores podem minimizar a gravidade clínica da hemofilia A²⁵⁵.

1.7.1.9 Implicações do diagnóstico molecular das hemofilias

O diagnóstico molecular determina com precisão a causa da hemofilia A. Os dados advindos dessa determinação disponibilizam potenciais informações quanto as características da doença, riscos de recorrência, modalidades de transmissão genética, arsenal diagnóstico pré e pós-natal, assim como suporte psicológico e emocional. Possibilitando, portanto a estruturação de um amplo programa de aconselhamento genético/orientação familiar^{256,257}.

O conhecimento de mutações naturais pode ainda levar a uma compreensão mais aprofundada das relações estruturais/funcionais do FVIII, bem como a uma melhor compreensão da relação genótipo-fenotípica da doença^{258, 259,260}.

Segundo recomendações da *UKHCDO* ("United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation"), o diagnóstico molecular da hemofilia A deve ser realizado em todos os pacientes acometidos pela doença. A análise genética é um requerimento básico para determinar com confiabilidade o perfil genético de mulheres relacionadas com indivíduos acometidos por hemofilia e, ainda, conhecer a influência do efeito da lionização nos níveis FVIII de mulheres sabidamente portadoras⁹⁴.

No Brasil, os estudos de caracterização molecular das hemofilias são escassos. Dentre os poucos estudos existentes, destacam-se aqueles de frequência genética e de expectativa de vida^{261,262}, detecção de polimorfismos em indivíduos negros²⁶³, estudo de portadoras por meio de RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism")²⁶⁴, análises de inversões por "Southern blotting" e reação em cadeia da polimerase (PCR) associada à técnica de SSCP^{265,243} e estudo de portadoras por meio de análise de repetições em tandem e de marcadores polimórficos²⁶⁶. Estudos mais recentes incluem o desenvolvimento de peptídeos sintéticos para a neutralização de anti-FVIII²⁶⁷ e a análise de inibidores em pacientes com inversões do íntron 1 e 22²¹⁶.

Em países desenvolvidos, especialmente os europeus, o diagnóstico molecular é ofertado a todos os pacientes com hemofilia A. Esta disponibilidade diagnóstica permitiu a elucidação de grande heterogeneidade de alterações genéticas, mesmo considerando a homogeneidade étnica das populações

estudadas. Embora a realização de diagnóstico molecular para a hemofilia A não seja ainda uma prática de rotina no Brasil, nossa população tem origem étnica diversificada, resultante da miscigenação de europeus, africanos, asiáticos e indígenas. Isso torna nosso grupo de estudo particularizado e distinto quanto à possibilidade de descrição de novas alterações genéticas e, por conseguinte, permite melhor compreensão da hemofilia A em nosso meio.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Determinar as bases moleculares da hemofilia A grave em uma população de pacientes atendidos no HEMOMINAS.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar levantamento do perfil de inibidores em pacientes com hemofilia A grave;

- Realizar levantamento do perfil sorológico para doenças virais dos pacientes com hemofilia A grave;

- Estabelecer a correlação entre o genótipo da hemofilia A e o desenvolvimento de inibidores;

- Correlacionar o perfil sorológico para doenças virais com o desenvolvimento de inibidores.

3 Metodologia

3.1 Delineamento Experimental

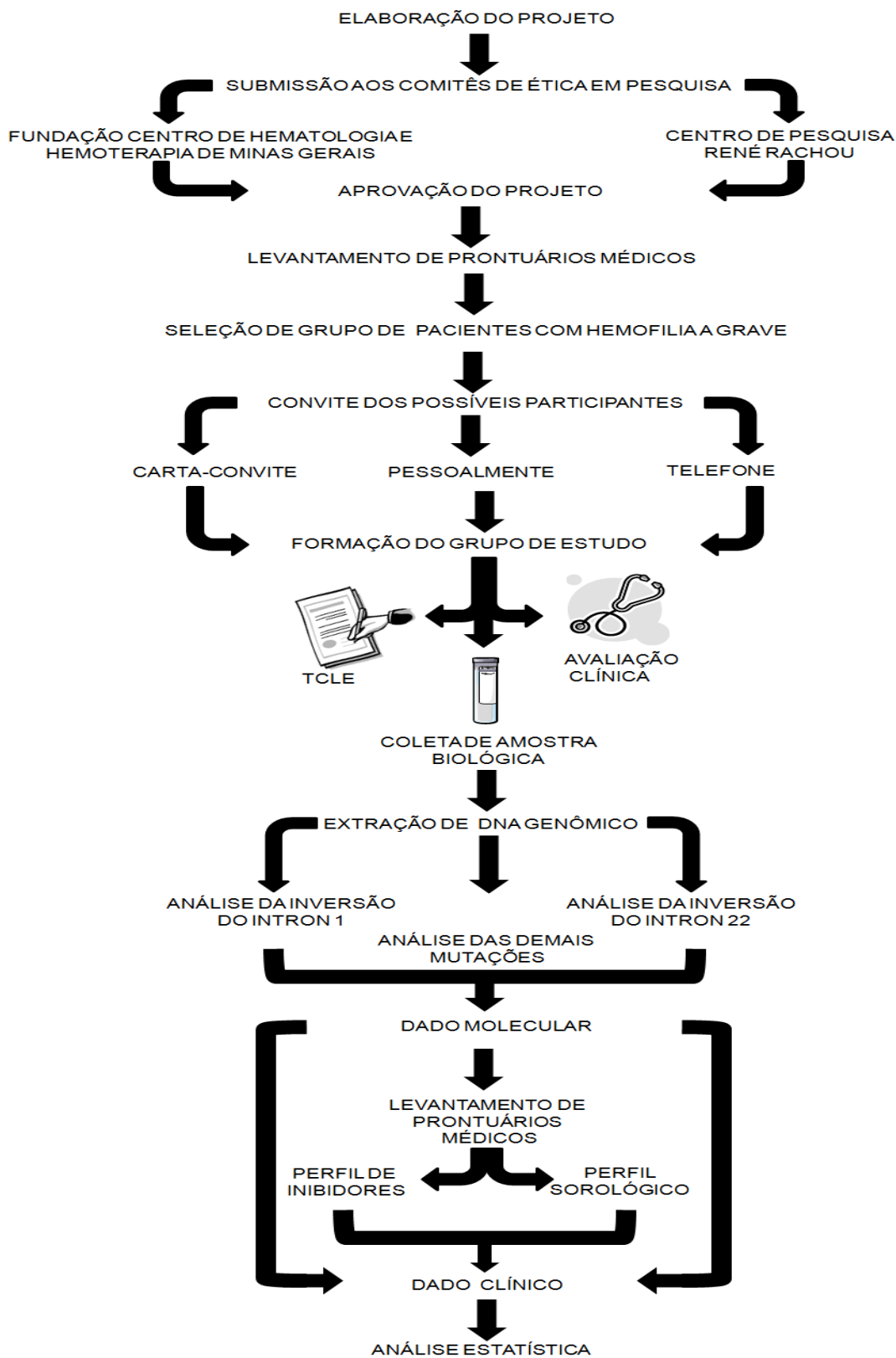


Figura 15: Estruturação esquemática da metodologia desenvolvida no trabalho.

3.2 Elaboração do projeto

O projeto “Caracterização Molecular da Deficiência Hereditária de Fator VIII em Pacientes Hemofílicos do Estado de Minas Gerais” foi elaborado Pela Dra Suely Meireles Rezende, na ocasião à frente do Serviço de Pesquisa da Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais (HEMOMINAS). O presente projeto contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

3.3 Submissão aos Comitês de Ética

O projeto “Caracterização Molecular da Deficiência Hereditária de Fator VIII em Pacientes Hemofílicos do Estado de Minas Gerais” foi submetido primeiramente ao Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais sob o registro 099 e teve sua aprovação mediante expedição do Parecer Consubstanciado (anexo 6.2). Posteriormente, o mesmo projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou sob o número de protocolo 04/2006 sendo sua aprovação mediante expedição do Parecer nº 11/2007 (anexo 6.3).

3.4 Levantamento de prontuários e seleção de pacientes

Os prontuários médicos de 678 pacientes com hemofilia A atendidos nas Unidades do HEMOMINAS foram analisados para a coleta dos dados laboratoriais relativos à dosagem de FVIII dos pacientes que ao longo de sua evolução clínica apresentaram pelo menos uma dosagem de FVIII inferior a 1% de atividade (critério estabelecido pelo “Subcommittee on Factor VIII and Factor IX of the Scientific and Standardization of ISTH”, para a forma clínica grave da hemofilia A)⁹⁹, foram incluídos no estudo.

Nesta etapa do trabalho foram selecionados 178 pacientes que atendiam ao critério estabelecido. Destes, 95 pacientes estavam cadastrados no Hemocentro de Belo Horizonte e 83 pacientes nas demais unidades do interior (Figura 16).

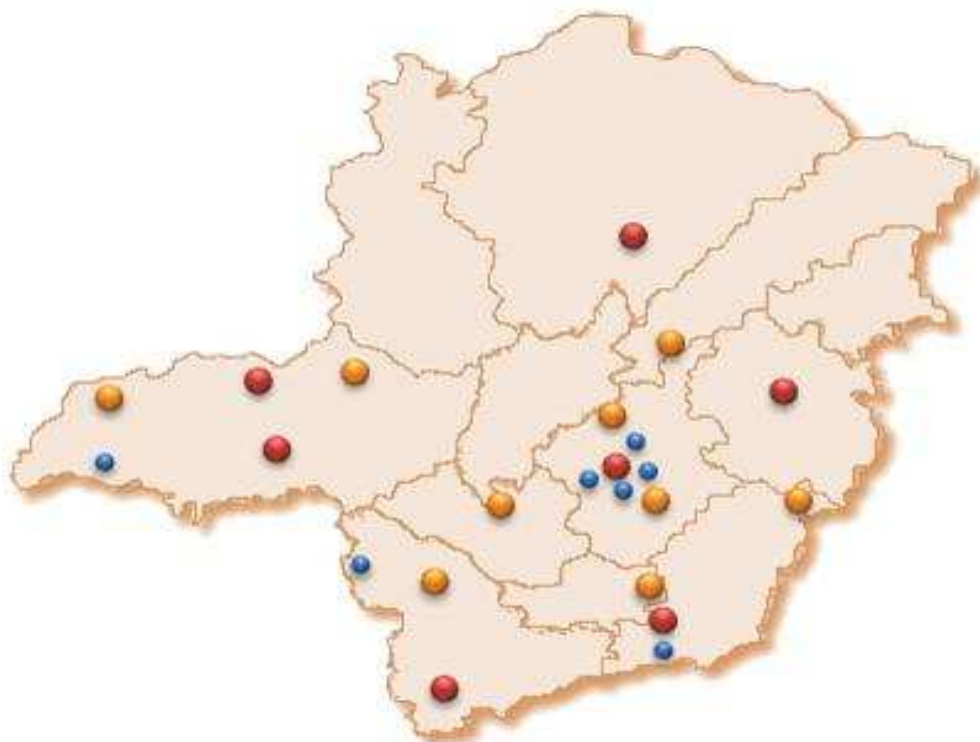


Figura 16. Representação esquemática das unidades de atendimento da Fundação HEMOMINAS. Pontos vermelhos, Hemocentros; pontos amarelos, Núcleos Regionais; pontos azuis, Agências Transfusionais.

3.5 Convite aos possíveis participantes da pesquisa

Os pacientes selecionados foram convidados a participar do estudo mediante envio de uma carta-convite. Nela o participante foi convidado para uma entrevista que elucidou os propósitos do estudo (Anexo 6.4). Outra forma de contato foi realizada por meio de telefonemas aos pacientes ou responsáveis, em caso de menores. Outra abordagem de contato foi realizada pessoalmente com os possíveis participantes quando os mesmos eram atendidos na unidade.

3.6 Formação do grupo de participantes

Dos 178 pacientes inicialmente convidados para participar do estudo, 150 aceitaram o convite, sendo 57 pacientes referenciados nas unidades do interior e 93 referenciados no Hemocentro de Belo Horizonte. Estes participantes, pertencentes a 122 famílias não relacionadas, foram esclarecidos quanto aos objetivos do estudo por meio das informações contidas no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

(TCLE), segundo normas da Resolução 196/96 (anexo 6.5). O TCLE foi assinado pelos participantes ou respectivos representantes legais. Em seguida, os participantes foram encaminhados para avaliação clínica realizadas pelas médicas hematologistas, Dra. Suely Meireles Rezende e Dra. Denise Zouain, que compilaram os dados clínicos de interesse em ficha de avaliação clínica (Anexo 6.6). Após a consulta, os pacientes foram encaminhados para a coleta de material biológico.

3.7 Coleta de amostra biológica

Foram coletadas amostras de 5-10 mL de sangue venoso em veia periférica, anticoagulado com o sal tripotássico do ácido etilenodiaminotetracético (K3EDTA) ou citrato de sódio 3,2%. Foi utilizado o sistema de coleta a vácuo, segundo Regulamento Técnico para funcionamento de Laboratórios Clínicos recomendada pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 302 de 13 de outubro de 2005²⁶⁸.

Em paralelo à coleta de amostra biológica dos participantes envolvidos no estudo, foram coletadas 96 amostras de sangue (70 mulheres e 26 homens) nas mesmas condições citadas acima, para formação de um grupo controle normal. Análises moleculares deste grupo seriam utilizadas para a discriminação entre polimorfismos e mutações de sentido trocado, especialmente aquelas ainda não descritas.

3.8 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada segundo metodologia estabelecida por Bowen e Keeney, 2003²⁶⁹. Segundo este método, ocorre o isolamento de DNA genômico por meio da lise celular (Tris-HCl, pH 8,0 10 mM, sacarose 11%, MgCl₂ 5mM, Triton X-100 1%) seguida da lise nuclear (Tris-HCl pH 8,0 10 mM, EDTA 10 mM, citrato de sódio 10 mM, SDS 1%) e da adição de 100 μ l de NaCl 6,0 M e de 500 μ l de clorofórmio. A mistura foi centrifugada para separação da fase aquosa e posterior precipitação com etanol absoluto.

O DNA obtido foi diluído em água bidestilada, quantificado por espectrofotometria no aparelho NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) e armazenado a -20°C até o momento de realização das análises moleculares.

3.9 Análise da inversão do íntron 1

Para a análise da inversão foi usada a técnica de PCR multiplex proposta por Bagnall e colaboradores²¹⁴. Esta técnica consta de duas reações independentes para a análise da inversão, uma para a amplificação de *Int1h-1* (cópia intragênica, reação 1) e outra para a amplificação de *Int1h-2* (cópia extragênica, reação 2). Quatro oligonucleotídeos (9F, Int1h-2F, 9cR, Int1h-2R)²¹⁴ são usados para as reações e, de acordo com a combinação dos oligos e padrão de amplificação, determina-se a presença ou não da mutação.

Para a reação 1, os oligonucleotídeos 9F, Int1h-2F e 9cR são combinados em uma reação que resultará na amplificação de um fragmento de 1908 pb para indivíduos sem a inversão ou de um fragmento de 1323 pb para indivíduos com a inversão. Para a reação 2, os oligonucleotídeos 9F, Int1h-2F e Int1h-2R são combinados em uma reação que resultará na amplificação de um fragmento de 1191 pb para indivíduos sem a inversão ou um fragmento de 1776 pb para indivíduos com a inversão (Tabela 6).

Assim, o padrão eletroforético de um indivíduo sem a inversão é um fragmento de 1908 pb e outro fragmento 1191 pb, enquanto o padrão eletroforético de um indivíduo com a inversão é um fragmento de 1776 pb e outro fragmento de 1323 pb. O padrão eletroforético de mulher portadora é de 4 fragmentos: 1908 pb, 1776 pb, 1323 pb e 1191 pb (Figura 17).

As amplificações foram realizadas em termociclador (Mastercycler Gradient, Hamburg, Alemanha). As reações de PCR constaram de um volume final de 25 μ l contendo de 100-200 ng de DNA genômico, 0,6 μ M de cada oligonucleotídeo (IDT, San Diego, CA, USA), 200 μ M de cada dNTP's (Fermentas, Vilnius, Lituânia), 1 unidade de Taq DNA polimerase, 1,5 mM de MgCl₂, 20 mM de Tris-HCl e 50 mM de KCl pH 8,4 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

As condições de amplificação constaram de um ciclo inicial de desnaturação de 7 minutos a 94°C seguidos de 30 ciclos de amplificação de 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos e uma etapa final de extensão de 72°C por 5 minutos. As reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5%, coradas com Safe DNA Stain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Em seguida foram visualizadas sob luz ultravioleta e a imagem foi armazenada em sistemas de fotodocumentação para gel de agarose (Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System-EDAS 290, Kodak, Melville, NY, USA).

Tabela 6. Descrição dos oligonucleotídeos²¹⁴ e padrões de amplificação para a análise da inversão do íntron 1 de *F8*.

Oligonucleotídeos para a análise da inversão do íntron 1		
Identificação	Sequência (5"-3")	Nº de bases
9cR	CTAGCTTGAGCTCCCTGTGG	20
9F	GTTGTTGGGAATGGTTACGG	20
Int1h-2F	GGCAGGGATCTTGTGGTAAA	21
Int1h-2R	TGGGTGATATAAGCTGCTGAGCTA	24

Descrição dos padrões de amplificação		
Reação	1	2
Sequência amplificada	Int1h-1(cópia Intragênica)	Int1h-2 (cópia extragênica)
Oligonucleotídeos utilizados	9F, Int1h-2F,9cR	9F,Int1h-2F,Int1h-2R
Amplificação de negativos	(9F/9cR)1908 pb	(Int1h-2F/Int1h-2R)1191 pb
Amplificação de positivos	(Int1h-2F/9cR) 1323 pb	(Int1h-2R/9F) 1726 pb
Amplificação de portadoras	(9F/9cR) 1908 pb (Int1h-2F/9cR) 1323 pb	(Int1h-2F/Int1h-2R)1191pb (Int1h-2R/9F)1726 pb

bp, pares de bases.

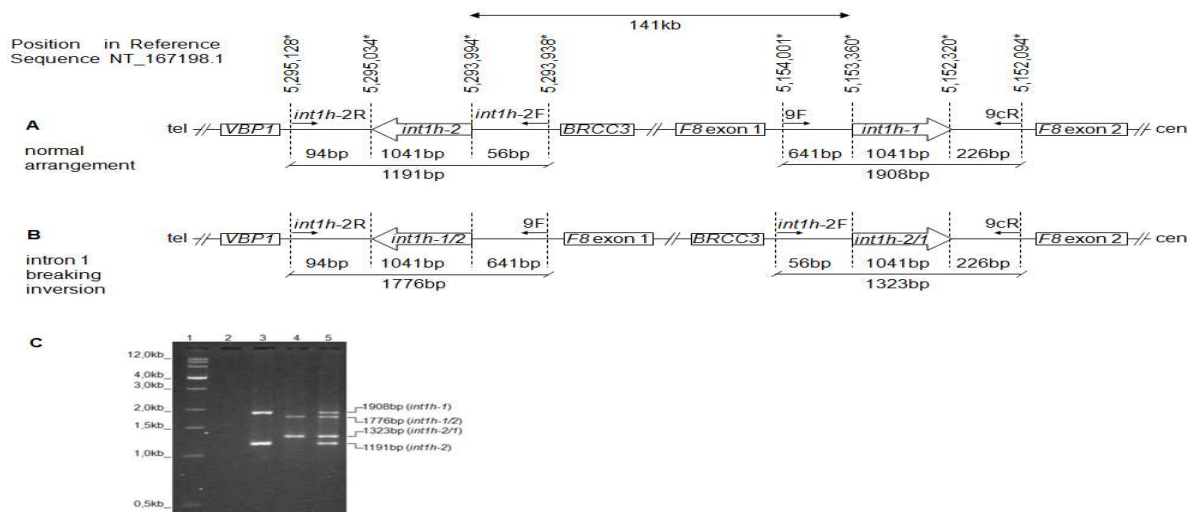


Figura 17. Representação esquemática da análise da inversão do íntron1 de *F8*. A, Xq28 localização das cópias Int1h-1 e Int1h-2 e oligonucleotídeos que amplificam a *int1h-1* e *int1h-2* normal; B, Xq28, mostrando a localização das cópias Int1h-1/2 e Int1h-2/1 com inversão; C, gel de eletroforese 1,5% mostrando os produtos de amplificação resultantes da análise da inversão do íntron1 de *F8*: 1, marcador (Perfect DNATM Markers, 0,5-12kbp, Novagen, Gibbstown, USA); 2, branco; 3, padrão de amplificação de um indivíduo negativo para inversão; 4, padrão de amplificação de um indivíduo positivo para a inversão; 5, padrão de amplificação de uma portadora da inversão. Ab: pb, pares de bases; Kb, kilobases; Cen, centrômero; Tel, telômero. Fonte: Pio et al., 2010²⁷⁰.

3.10 Análise da inversão do íntron 22

Para detectar esta inversão foi utilizada a técnica de I-PCR (PCR inverso) recentemente desenvolvida por Rossetti e colaboradores, 2005²⁷¹. Três oligonucleotídeos são usados em uma única reação para a determinação da inversão do íntron 22 (tipo 1 e tipo 2) e de acordo com a combinação dos oligonucleotídeos e padrão de amplificação, determina-se a presença ou não da mutação, além do estado de portador (Tabela 7).

Tabela 7. Oligonucleotídeos e padrões de amplificação para a análise da inversão do íntron 22 de *F8*.

Oligonucleotídeos para a análise da inversão do íntron 22 ²⁷¹		
Identificação	Sequência (5"-3")	Nº de bases
IU	CCTTTCAACTCCATCTCCAT	20
ID	ACATACGGTTTAGTCACAAGT	21
ED	TCCAGTCACTTAGGCTCAG	19
Descrição dos padrões de amplificação		
oligonucleotídeos	IU, ED, ID	
Amplificação dos negativos	(IU/ID) 487 pb	
Amplificação dos positivos	(IU/ED) 559 pb	
Amplificação de portadoras	(IU/ED) 457 pb / (IU/ID) 559 pb	

bp, pares de bases.

Para a realização do I-PCR, 1-2 μ l de DNA genômico foram digeridos por quatro horas (ou alternativamente "overnight") em uma reação contendo 10 unidades de endonuclease de restrição *Bcl*I (Fermentas, Vilnius-Lituânia) sob condições recomendadas pelo fabricante. Os fragmentos de DNA foram extraídos com solução de fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico e precipitados em dois volumes de etanol com NaCl 0,3 M. Os fragmentos digeridos e purificados foram diluídos em 50 μ l de água destilada e circularizados em reação de ligação contendo T4 DNA ligase (Fermentas, Vilnius, Lituânia) sob condições recomendadas pelo fabricante. Após 15 horas de incubação a 16°C, os anéis foram extraídos com solução de fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico e precipitados em dois volumes de etanol com NaCl 0,3 Molar (M). Os anéis purificados foram usados como molde para a reação de PCR (Figura 18).

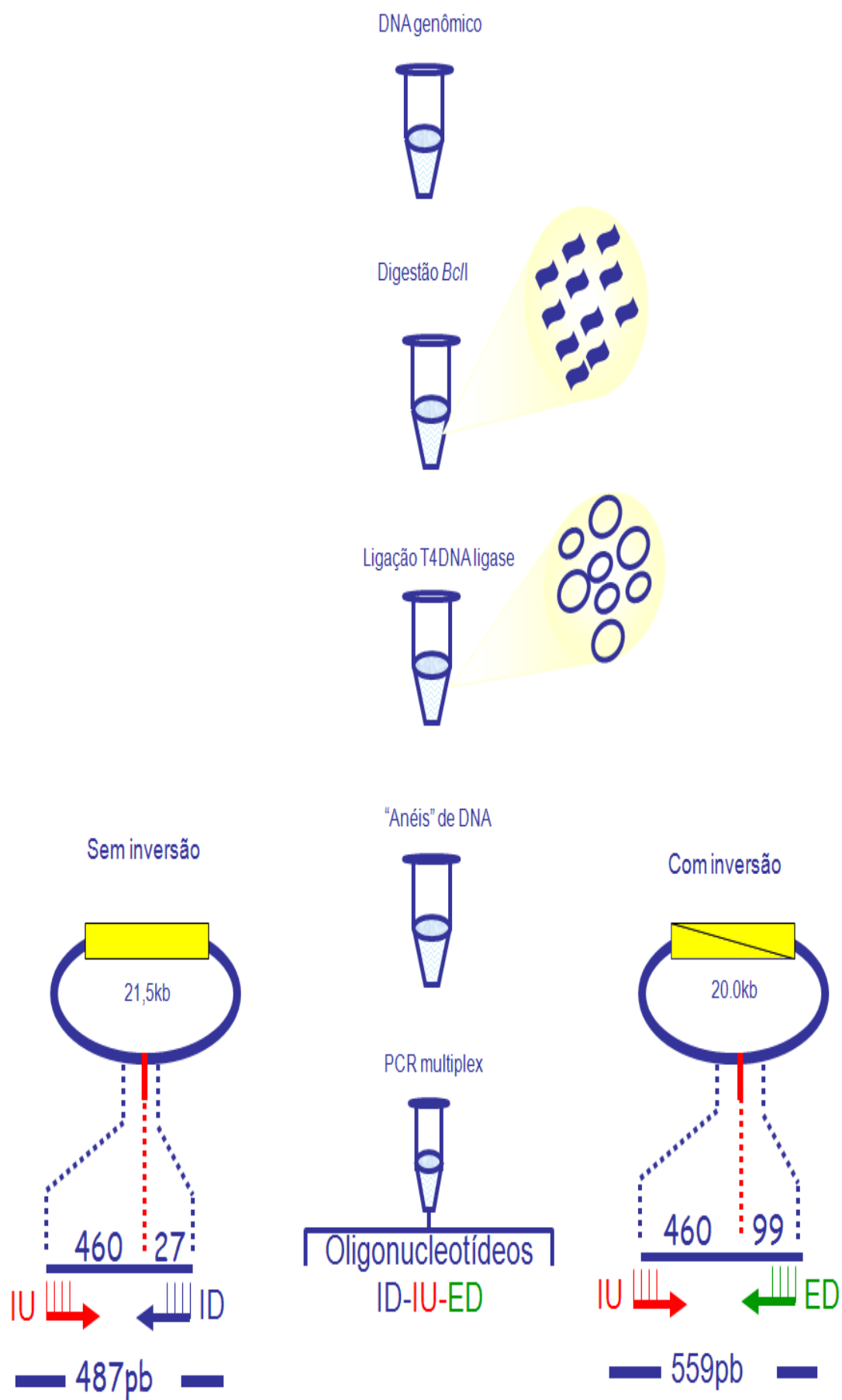


Figura 18. Representação esquemática das etapas usadas para a análise da inversão do íntron 22. (Adaptado de Rossetti et al., 2005²⁷¹).

As amplificações foram realizadas em termociclador (Mastercycler Gradient, Hamburg, Alemanha). As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25 μ l contendo 200-400ng dos fragmentos circularizados, 0,6 μ M de cada olinucleotídeo (IDT, San Diego, CA, USA), 200 μ M de cada dNTP's (Fermentas, Vilnius, Lituânia), 1 unidade de Taq DNA polimerase, 1,5 mM de MgCl₂, 20 mM de Tris-HCl e 50 mM de KCl pH 8,4 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As condições de amplificação constaram de um ciclo inicial de desnaturação de 2 minutos a 94°C seguidos de 30 ciclos de amplificação de 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 90 segundos e um ciclo final de extensão de 72°C por 5 minutos.

A interpretação dos resultados foi realizada mediante a diferença de dos fragmentos amplificados sendo que, pacientes sem a inversão apresentam fragmentos de 487pb resultante da combinação dos oligonucleotídeos IU-ID e pacientes com a inversão apresentam fragmentos de 559pb resultante da combinação dos oligonucleotídeos IU-ED.

Esta técnica permite, ainda, a análise de portadoras, que no caso, apresentam ambos os fragmentos de 487 e 559 pb. As amplificações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% e coradas Safe DNA Stain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Em seguida foram visualizadas sob luz ultravioleta e a imagem foi armazenada em sistemas de fotodocumentação para gel de agarose (Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System-EDAS 290, Kodak, Melville, NY, USA).

3.11 Análise das demais mutações

3.11.1 Amplificação da região codificadora de *F8*

Pacientes que foram negativos para as análises da inversão do íntron 1 e do íntron 22 tiveram a região codificadora de *F8*, bem como regiões que flanqueiam cada um dos éxons, amplificadas por PCR. Para as amplificações foram usados 37 pares de oligonucleotídeos desenhados por Steven Keeney (<http://hadb.org.uk>)²⁰⁸.

Todos os oligonucleotídeos (senso e antisenso) foram desenhados com a adição de 17 bases em sua extremidade 5". Esta adição refere-se a uma cauda N13 obtida a partir de modificações dos oligonucleotídeos desenhados para o fago M13. Esta modificação permitiu a uniformidade de condições de realização das amplificações para todos os éxons (Tabela 8).

As amplificações foram realizadas em termociclador (Mastercycler Gradient, Hamburg, Alemanha). As reações de PCR constaram de um volume total de 25 μ l contendo 200ng de DNA genômico, 0,6 μ M de cada olinucleotídeo (IDT, San Diego, CA, USA), 200 μ M de cada dNTP's (Fermentas, Vilnius, Lituânia), 1 unidade de Taq DNA polimerase, 1,5 mM de MgCl₂, 20 mM de Tris-HCl e 50 mM de KCl pH 8,4 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As condições de reação foram 95°C por 2 minutos, 30 ciclos de amplificação de 94°C por 30 segundos, 59°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos e um passo de extensão final de 72°C por 5 minutos. As amplificações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% e coradas com Safe DNA Stain (Invitrogen Carlsbad, CA, USA). Em seguida foram visualizadas sob luz ultravioleta e a imagem digitalizada em sistemas de fotodocumentação para gel de agarose (Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System-EDAS 290, Kodak, Melville, NY, USA).

Tabela 8. Oligonucleotídeos²⁰⁸ usados na amplificação dos éxons de *F8* e seus respectivos tamanhos sem/com caudas N13

Oligonucleotídeos para análise dos éxons de <i>F8</i>		
Identificação	Seqüências	pb
F8P2F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> GAGCTCACCATGGCTACATTC	561
F8P2R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> AATTTAAACTATAAAGCGAGTCCTG	595
F8P1F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> GGACCTAGGCCATGGTAAAGA	600
F8P1R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> TGCAGAGCATTTTAAGGAAC TTT	634
F8EX1F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TAGCAGCCTCCCTTTTGCTA	480
F8EX1R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> CTAACCCGATGTCTGCACCT	514
F8EX2F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> CATTACTTCCAGCTGCTTTTTG	290
F8EX2R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> TTTGGCAGCTGCACTTTTTA	333
F8EX3F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> GCATGCTTCTCCACTGTGAC	299
F8EX3R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> GCCACCATTACAAAGCACAC	324
F8EX4F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> CATGTTTCTTTGAGTGTACAGTGG	372
F8EX4R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> TTCAGGTGAAGGAACACAAATG	406
F8EX5F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TCTCCTCCTAGTGACAATTTCC	259
F8EX5R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> CCCATCTCCTTCATTCTGA	293
F8EX6F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> GCGGTCATTCATGAGACACA	258
F8EX6R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> CCGAGCTGTTTGTGAACTGA	292
F8EX7F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TGTCCTAGCAAGTGTTTTCCATT	400
F8EX7R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> AATGTCCCCTTCAGCAACAC	434

F8EX8F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> CACCATGCTTCCCATATAGC	484
F8EX8R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> ATGGCTTCAGGATTTGTTGG	518
F8EX9F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TTTGAGCCTACCTAGAATTTTTCTTC	300
F8EX9R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> GGTATTTTAGAACTCAAACTCTCC	334
F8EX10F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TTCTTGTTGATCCTAGTCGTTTT	250
F8EX10R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> GCTGGAGAAAGGACCAACATA	284
F8EX11F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> CCCTTGCAACAACAACATGA	362
F8EX11R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> TTTCTTCAGGTTATAAGGGGACA	396
F8EX12F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TGCTAGCTCCTACCTGACAACA	298
F8EX12R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> CATTCATTATCTGGACATCACTTTG	332
F8EX13F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> CATGACAATCACAATCCAAAATA	364
F8EX13R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> CATGTGAGCTAGTGGGCAA	398
F8EX14AF	<i>gtagcgcgacggccagt</i> CTGGGAATGGGAGAGAACCT	567
F8EX14AR	<i>cagggcgcagcgatgac</i> ATGTCCCCTACTGTGATGGAG	601
F8EX14BF	<i>gtagcgcgacggccagt</i> GATCCATCACCTGGAGCAAT	599
F8EX14BR	<i>cagggcgcagcgatgac</i> GGGCCATCAATGTGAGTCTT	633
F8EX14CF	<i>gtagcgcgacggccagt</i> AGCTCATGGACCTGCTTTGT	695
F8EX14CR	<i>cagggcgcagcgatgac</i> CATTCTCTTGGATTAATGTTTCCTT	729
F8EX14DF	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TCCAAGCAGCAGAAACCTATT	595
F8EX14DR	<i>cagggcgcagcgatgac</i> AGTAATGGCCCCTTTCTCCT	624
F8EX14EF	<i>gtagcgcgacggccagt</i> GGATGACACCTCAACCCAGT	570
F8EX14ER	<i>cagggcgcagcgatgac</i> CCTTCCACGAGATCCAGATG	604
F8EX14FF	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TCCCTACGGAACTAGCAATG	686
F8EX14FR	<i>cagggcgcagcgatgac</i> TCACAAGAGCAGAGCAAAGG	720
F8EX15F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TGAGGCATTTCTACCCACTTG	299
F8EX15R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> CCAAAAGTGGGAATACATTATAGTCA	333
F8EX16F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> CAGCATCCATCTTCTGTACCA	468
F8EX16R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> AAAGCTTCTTATTGCACGTAGG	502
F8EX17F	<i>gtagcgcgacggccagtc</i> AGGTTGGACTGGCATAAAAA	397
F8EX17R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> CCCTGGATCAAGTCTCATTTG	431
F8EX18F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TGGTGGAGTGGAGAGAAAGAA	362
F8EX18R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> AGCATGGAGCTTGTCTGCTT	396
F8EX19F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> AACCAATGTATCTCATGCTCATTTT	248
F8EX19R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> GGAAGAAAGCTGTAAAGAAGTAGGC	282

F8EX20F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TTTGAGAAGCTGAATTTTGTGC	228
F8EX20R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> GAAGCATGGAGATGGATTCATTA	262
F8EX21F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> CCACAGCTTAGATTAACCTTTCTCA	261
F8EX21R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> TGAGCTTGCAAGAGGAATAAGTAA	295
F8EX22F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TCAGGAGGTAGCACATACAT	287
F8EX22R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> GTCCAATATCTGAAATCTGC	321
F8EX23F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TTGACAGAAATTGCTTTTTACTCTG	294
F8EX23R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> TCCCCCAGTCTCAGGATAACT	328
F8EX24F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> ACTGAGGCTGAAGCATGTCC	250
F8EX24R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> CCCAACCACTGCTCTGAGTC	284
F8EX25F	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TGGGAATTTCTGGGAGTAAATG	300
F8EX25R	<i>cagggcgcagcgatgac</i> AAGCTCTAGGAGAGGTGGTATTTTT	334
F8EX26AF	<i>gtagcgcgacggccagt</i> CTGTGCTTTGCAGTGACCAT	557
F8EX26AR	<i>cagggcgcagcgatgac</i> TTCTACAACAGAGGAAGTGGTGA	591
F8EX26BF	<i>gtagcgcgacggccagt</i> GGAGAAACCTGCATGAAAGC	596
F8EX26BR	<i>cagggcgcagcgatgac</i> TTGGCCATCACAAATTTCAA	630
F8EX26CF	<i>gtagcgcgacggccagt</i> TGCAAATGTGCATTTTTCTGA	580
F8EX26CR	<i>cagggcgcagcgatgac</i> CCTCCAGCCCCCTTTACTAT	614
F8EX26DF	<i>gtagcgcgacggccagt</i> CCACCCCCATAAGATTGTGA	580
F8EX26DR	<i>cagggcgcagcgatgac</i> CTGAAGAAACCAGCAGGAAAA	614
F8EX26EF	<i>gtagcgcgacggccagt</i> CCCCAAAGGTGATATGGTTTT	230
F8EX26ER	<i>cagggcgcagcgatgac</i> TCAGTGTTACATTTTTATTCCA	264

As extremidades N13F e N13R estão indicadas em itálico.

3.11.2 Purificação dos produtos amplificados

A purificação dos produtos de PCR amplificados foi realizada por um único passo de precipitação usando solução de PEG (polietileno glicol 8000) contendo 26,2% de PEG 8000, 6,6 mM de cloreto de magnésio e 0,6 M de acetato de sódio pH 5,2 segundo protocolo estabelecido por Rosenthal et al.,1993²⁷² com modificações. Os produtos de PCR foram adicionados a igual volume de solução de PEG, cuidadosamente homogeneizados e incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 13000 rotações por minuto (rpm) durante 25 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e os produtos de

PCR sedimentados foram lavados com etanol absoluto e, em seguida, etanol 85%. A seguir, o sobrenadante foi diluído em água bidestilada e quantificado por espectrofotometria no equipamento NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA)

3.11.3 Reações de Sequenciamento

O ciclo de sequenciamento foram realizados com o sistema o Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystem, California, USA). As reações com volume final de 10 μ l consistiram de 10-30 ng de produto de PCR purificado, 3,2 picomoles (pmol) de oligonucleotídeos (senso ou antisenso), Big Dye e tampão de reação para concentração final de 1X. As reações foram realizadas em termociclador (Mastercycler Gradient, Hamburg, Alemanha) sob as seguintes condições: ciclo inicial de desnaturação de 96°C por 2 minutos, seguidos de 44 ciclos de 96°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos.

A purificação dos produtos da extensão foi realizada mediante adição de quatro volumes de isopropanol 65% e subsequente incubação à temperatura ambiente por 15 minutos sob proteção da luz. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3750 rpm por 45 minutos. Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 10 volumes de etanol 70% e as amostras foram novamente centrifugadas a 3750 rpm por 15 minutos. Após o descarte do sobrenadante, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente sob proteção da luz por 30 minutos.

Finalmente, as amostras foram previamente eluídas em formamida, pré-aquecidas a 95°C por 5 minutos e submetidas à eletroforese por capilaridade usando o seqüenciador automático ABI Prism 3100 Genetic Analyzer ou 3130 Genetic analyzer (Applied Biosystem, Califórnia, USA).

3.11.4 Análises das sequências

Os eletroferogramas foram analisados pelo programa *Sequence Scanner* (<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/support/software/>)²⁷³ cujo valor de alta qualidade para bases varia entre 50-99% (Figura 19). As sequências foram ainda analisadas e alinhadas pelo programa SeqAssem DNA Contg Assembly Software (http://www.sequentix.de/software_seqassem.php/)²⁷⁴. Nomenclatura para

a identificação das alterações foi baseada nas orientações do Human Genomic Variation Society, HGVS (<http://www.HGVS.org/mutnomen/>)²⁷⁵.

Quality Value (QV) = $-10\log_{10}(Pe)$ where Pe is Probability of Error

QV	Pe	QV	Pe	QV	Pe	QV	Pe	QV	Pe
1	79%	11	7.9%	21	0.79%	31	0.079%	50	0.001%
2	63%	12	6.3%	22	0.63%	32	0.063%	60	0.0001%
3	50%	13	5.0%	23	0.50%	33	0.050%	70	0.00001%
4	39%	14	3.9%	24	0.39%	34	0.039%	80	0.000001%
5	31%	15	3.1%	25	0.31%	35	0.031%	90	0.0000001%
6	25%	16	2.5%	26	0.25%	36	0.025%	99	0.00000012%
7	20%	17	2.0%	27	0.20%	37	0.020%		
8	15%	18	1.5%	28	0.15%	38	0.015%		
9	12%	19	1.2%	29	0.12%	39	0.012%		
10	10%	20	1.0%	30	0.10%	40	0.010%		

Figura 19: Parâmetros de qualidade estabelecidos pelo programa *Sequencer scanner*

3.12 Levantamento de prontuários médicos

Os prontuários médicos de todos os pacientes com hemofilia A, com perfil molecular determinado, foram analisados para a coleta de dados laboratoriais relativos à dosagem de inibidores, e perfil sorológico. Todos os dados foram anotados em fichas de coleta de dados (Anexos 6.7).

3.12.1 Coleta de dados sobre inibidores

Inibidores são mensurados por testes qualitativos (teste de mistura e pesquisa de inibidores) e por testes quantitativos (dosagem de inibidores). Para a coleta de inibidores foram considerados apenas os testes quantitativos cujas dosagens foram superiores a uma unidade Bethesda por mL (UB/ml) realizados a partir de 1993.

3.12.2 Coleta de dados do perfil sorológico

Foram coletados dados relativos aos seguintes marcadores sorológicos: HIV, HTLV, HBSAg, anti-HBs, anti-HBc, anti-HCV e HCV confirmatório, tomando como referência a última avaliação sorológica do paciente.

3.13 Análise estatística

Pacientes foram classificados de acordo com cada uma das variáveis de interesse: categoria de mutação, presença de inibidor e perfil sorológico (anti-HTLV I/II, anti-HCV, anti-HBs, HbsAg, anti-HbC e anti-HIV I/II). Foi realizada análise univariada (descritiva) e bivariada (variáveis de associação: categoria de mutação e presença/ausência de inibidores). Foram considerados como ponto de corte para associação valores de p inferiores a 0,05 para os testes Qui-quadrado e Teste exato de Fisher.

4 Resultados

4.1 Pio SF, Oliveira GC, Rezende SM. The molecular bases of hemophilia A. Rev Assoc Med Bras. 2009 Mar-Apr;55(2):213-9.

Artigo de Revista

AS BASES MOLECULARES DA HEMOFILIA A

SIMONE FERREIRA PIO¹, GUILHERME CORRÊA DE OLIVEIRA², SUELY MEIRELES REZENDE³

Trabalho realizado pelo Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ; Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais; Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

RESUMO

As hemofilias são doenças hemorrágicas resultantes da deficiência de fator VIII (hemofilia A) ou de fator IX (hemofilia B) da coagulação, decorrentes de mutações nos genes que codificam os fatores VIII ou IX, respectivamente. A hemofilia A é mais frequente que a hemofilia B e acomete aproximadamente 1:10.000 nascimentos masculinos. A gravidade e frequência dos episódios hemorrágicos está relacionado ao nível residual de atividade de fator VIII presente no plasma e este relaciona-se ao tipo de mutação associada à doença. A clonagem do gene do fator VIII tornou possível o conhecimento das bases moleculares da hemofilia A, sendo hoje conhecidas mais de 1.000 mutações associadas à doença. O conhecimento das bases moleculares da hemofilia A permite uma melhor compreensão da relação genótipo-fenótipo da doença, tomada de condutas clínicas diferenciadas em casos de mutações associadas a um maior risco de desenvolvimento de Inibidor, determinação da condição de portadora de hemofilia em mulheres relacionadas aos pacientes, implementação de programa de aconselhamento genético/orientação familiar e melhor compreensão das relações estruturais-funcionais do gene-proteína. Este artigo propõe revisar as bases moleculares da hemofilia A, os métodos laboratoriais utilizados para a caracterização das mutações e as implicações clínicas envolvidas no diagnóstico molecular da hemofilia A.

UNITERMOS: Hemofilia A. Mutação. Diagnóstico molecular. Determinação de portadoras. Genes. Fator VIII.

*Correspondência:
Departamento de Clínica
Médica - Faculdade de
Medicina
Avenida Alfredo Balena,
190 - 2º andar - sala 243
CEP 30130-110 - Belo
Horizonte - MG
Tel/FAX: (31) 3409-9746/45
srezende@medicina.ufmg.br

INTRODUÇÃO

A coagulação do sangue consiste em uma série de reações bioquímicas sequenciais envolvendo a interação de proteínas, comumente referidas como fatores da coagulação, além de células (em particular, as plaquetas) e íons. O processo, em última análise, leva à formação de um coágulo, cujo principal componente é a fibrina¹. Deficiências dos fatores da coagulação podem ocasionar doenças hemorrágicas (coagulopatias). As principais manifestações clínicas destas doenças são os sangramentos que podem ocorrer de forma espontânea ou induzida por trauma ou cirurgia. Dentre todas coagulopatias, as hemofilias e a doença de von Willebrand são as mais frequentes. O primeiro relato conhecido sobre hemofilia encontra-se em um decreto do Talmude (livro de condutas do povo judeu) datado do século II d.C. Neste decreto, o relator isenta da circuncisão crianças provenientes de famílias que tenham sofrido duas mortes decorrentes de hemorragias após o procedimento. Desde então, a hemofilia soma mais de 1.800 anos de história, contada por esparsos casos durante a Idade Média, por estudos pioneiros durante o século XIX e por avanços da bioquímica e genética ao longo do século XX^{2,3}.

Aspectos gerais da hemofilia

Sabe-se hoje que as hemofilias são doenças resultantes da deficiência quantitativa dos fatores VIII (hemofilia A) ou IX (hemofilia B) da coagulação, podendo decorrer de fatores adquiridos ou hereditários. As formas adquiridas, mais raras, são resultantes do desenvolvimento de autoanticorpos, associados a doenças autoimunes, câncer ou causas de origem idiomática. A hemofilia hereditária resulta de alterações genéticas nos genes que codificam o fator VIII (hemofilia A) ou IX (hemofilia B) da coagulação⁴. A hemofilia A hereditária é o assunto desta revisão.

A hemofilia A, também conhecida como hemofilia clássica, é mais comum do que a hemofilia B na proporção de aproximadamente 4:1. Em diversas populações étnicas e geograficamente distintas já estudadas, a prevalência da hemofilia A é de 1:10.000 nascimentos masculinos. Esta frequência parece não variar consideravelmente entre as populações e tem sido mantida por um equilíbrio entre a perda de mutações, por exemplo, no caso de um paciente com hemofilia que tem somente filhos homens e não transmite aos mesmos a doença, e o aparecimento de mutações espontâneas⁵.

O quadro clínico da hemofilia A é marcado pela recorrência de hemorragias, principalmente em articulações (hemartroses)

1. Doutoranda, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ; ² Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG.

2. Pesquisador, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ. Belo Horizonte, MG, Brasil

3. Professora-adjunta do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG.

e músculos (hematomas), podendo também ocorrer em outros locais do corpo e, em casos mais graves, hemorragias internas e do sistema nervoso central. A frequência e a gravidade dos episódios hemorrágicos dependem do nível residual do fator VIII (FVIII:Ag) presente no plasma e sua respectiva atividade funcional (FVIII:C). É em função deste nível de concentração e de atividade que a hemofilia A é usualmente classificada nas formas grave (< 0,01 UI/mL de FVIII:Ag e/ou < 1% de FVIII:C), moderada (< 0,01- 0,05 UI/mL de FVIII:Ag e/ou < 1-5% de FVIII:C) e leve (> 0,05 a < 0,40 UI/mL de FVIII:Ag e/ou > 5% e < 40% de FVIII:C). A frequência de hemofilia leve, moderada e grave é de 50%, 10% e 40%, respectivamente^{6,7}.

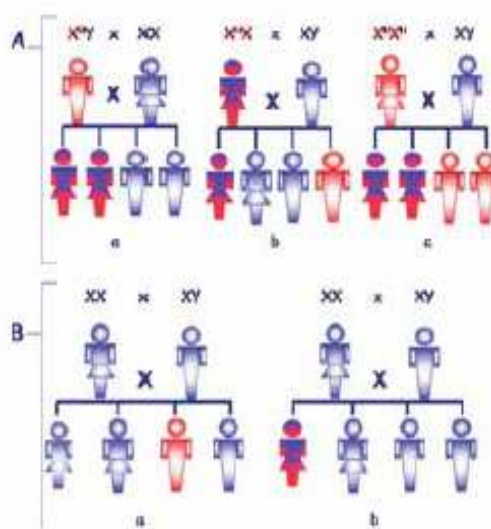
Aspectos genéticos da hemofilia

Por ser uma doença genética recessiva ligada ao cromossomo X, a hemofilia A afeta quase exclusivamente homens. Homens possuem um único alelo de fator VIII (XY) enquanto as mulheres possuem dois alelos (XX). Homens com um alelo com mutação (X^hY, hemizigose) terão a doença, enquanto mulheres com um único alelo com mutação (X^hX, heterozigose) serão portadoras e, portanto, com 50% de probabilidade de transmitir o alelo anormal à sua prole, em cada gestação. Já as mulheres com mutações em ambos os alelos (X^hX^h, homozigose) manifestarão a doença, embora esta seja uma situação muito rara (Figura 1A). Cerca de 30% dos pacientes diagnosticados com hemofilia A não possuem história familiar prévia da doença (Figura 1 B). Estes casos são explicados pela ocorrência de mutações espontâneas que podem acontecer em duas situações: (I) durante a gametogênese de um dos progenitores. Neste caso, a mutação ocorre em uma das células da linhagem germinativa e persiste em todos os descendentes clonais da mesma e em uma proporção dos gametas, caracterizando o mosaicismos germinativo; (II) a mutação pode também ocorrer durante os primeiros estágios da embriogênese do paciente afetado. Nesta situação, uma das células, presentes nos estágios iniciais do embrião em formação, sofre mutação e esta é repassada às demais células por meio de mitoses sucessivas, fazendo com que, o indivíduo possua tanto células normais quanto alteradas. Este fato caracteriza o mosaicismos somático^{8,9}.

O gene do fator VIII

Enquanto aspectos clínicos e bioquímicos da hemofilia A são conhecidos há décadas, as bases moleculares da doença somente foram compreendidas a partir de 1984 após a clonagem e caracterização do gene que codifica o fator VIII (F8). Este gene está localizado na extremidade do braço longo do cromossomo X (porção Xq28) e compreende 186.000 pb (pares de bases) distribuídos entre 26 éxons e 25 introns que variam de 69 a 3.106 pb e de 0,2 a 32,4 kb (kilobases, 1.000 pares de bases), respectivamente. Toda a sequência do gene compreende aproximadamente 9 kb de éxons e 177 kb de introns que, juntos, correspondem a cerca de 0,1% de todo o cromossomo X¹⁰ (Figura 2). Outras características de F8 devem ainda ser enfatizadas: (I) a presença de cerca de 70 ilhas CpG, das quais 2% estão em sequências codificadoras; (II) o grande tamanho do éxon 14 (3.106 pb), que representa cerca de 40% da região codificadora, mas que codifica a parte funcionalmente menos importante da proteína (Figura 2) e (III) o grande tamanho do intron 22, que apresenta uma ilha de CpG que funciona como

Figura 1 - Representação esquemática do padrão de herança de hemofilia A



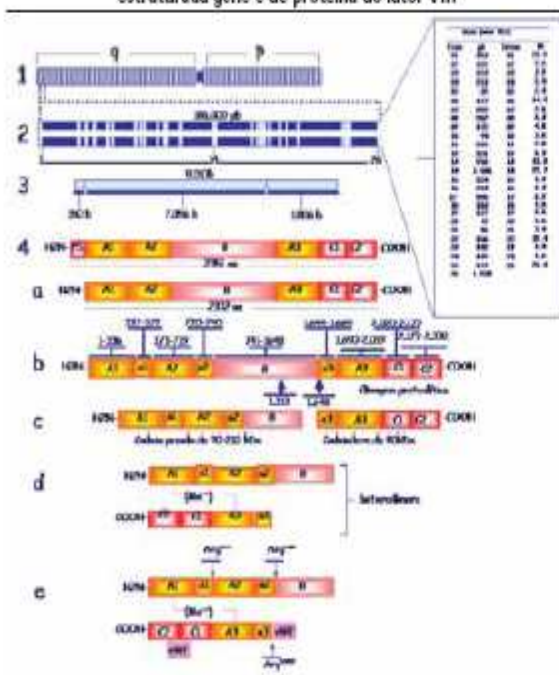
(Aa): Possibilidades genéticas da prole de um homem com hemofilia A (X^hY; hemizigose) com uma mulher normal para essa característica; a prole será constituída por 100% de portadoras de hemofilia A e 100% de homens normais para esta característica. (Ab): Possibilidades genéticas da prole de uma portadora (X^hX; heterozigose) com um homem normal para essa característica; a prole será constituída por 50% de chance de nascimento de portadora e 50% de chance de nascimento de paciente com hemofilia para cada gestação de mulher ou homem, respectivamente. (Ac): Possibilidades genéticas da prole de uma mulher com hemofilia (X^hX^h; homozigose) com um homem normal para essa característica; a prole será constituída por 100% de portadoras de hemofilia A e 100% de homens com hemofilia. (Ba, Bb): Prole de dois casos normais e sem história familiar de hemofilia A, demonstrando a ocorrência de mutação espontânea com geração de um homem com hemofilia A (Ba, homem em vermelho) e uma portadora (Bb, mulher mesclada).

promotor bidirecional para dois transcritos adicionais denominados F8A e F8B¹¹

F8A possui 1,8 kb, não apresenta introns e é transcrito em direção oposta a F8. Já F8B possui 2,5 kb e é transcrito na mesma direção de F8, sendo parcialmente sobreposto ao mesmo (éxons 23 -26). As sequências de F8A e da ilha de CpG formam uma região de aproximadamente 9,5 kb denominadas Int22h1. Esta sequência possui similaridade com duas cópias extragênicas (Int22h2 e Int22h3) localizadas aproximadamente entre 400-500 kb anteriores a porção telomérica de F8. A ocorrência de uma segunda região com alto grau de similaridade envolvendo sequência Intra e extragênica pode ser observada neste gene. Esta corresponde a uma região de aproximadamente 1 kb, mais exatamente 1.041 pb, presente no intron 1, denominada Int1h1. A região de alta similaridade correspondente está localizada a aproximadamente 140 kb anteriores a porção telomérica de F8. Essa cópia extragênica é denominada Int1h2. Estas regiões de alta similaridade funcionam como sítios de recombinação homóloga e determinam rearranjos intragênicos^{12,13} (Figura 3).

Outra característica importante deste gene é seu baixo índice de polimorfismo. Os polimorfismos observados neste gene são de dois tipos: SNPs (polimorfismo de único nucleotídeo) e VNTRs (sequências de número variável repetidas em "tan-

Figura 2 - Representação esquemática da localização cromossômica e estruturada gene e de proteína do fator VIII



1. Ilustração esquemática do cromossomo X com os braços "p" (braço curto) e "q" (braço longo); 2. Detalhamento do gene do fator VIII na região Xq28 com extensão de 186.000 pb distribuídos em 26 exons; 3. Transcrito maduro de F8 com 9.010 bases; 4. Proteína precursora do fator VIII composta por 2.351 aminoácidos das quais 19 correspondem ao peptídeo sinal; a. Estrutura primária da proteína com 2.332 aminoácidos e a apresentação dos seus domínios A1, A2, B, A3, C1 e C2; b. Detalhamento da estrutura primária do fator VIII demonstrando os limites dos aminoácidos correspondentes a cada um dos domínios; c. e d. Fator VIII após clivagens proteolíticas resultando em um heterodímero ligado por metal bivalente; e fator VIII no ambiente extracelular associado ao fator de von Willebrand, as setas indicam sítios de clivagem resultaram na ativação do fator VIII. Abreviações: PS, peptídeo sinal; b: base; pb, pares de base; p: braço curto; q: braço longo; vWF, fator de von Willebrand

dem¹³). Essas variações têm relevância clínica no contexto de doenças hereditárias, uma vez que podem ser usados para rastrear um gene mutado em uma família afetada. Entretanto, deve-se considerar as diferenças nas frequências de alelos entre populações distintas, pois *loci* de grande interesse diagnóstico podem diferir de acordo com a etnia da população, assim como com o desequilíbrio de ligação¹⁴.

Do mRNA do fator VIII à proteína

O transcrito de F8 tem cerca de 9010 b de tamanho com uma curta região 5' não traduzida (150 pb), uma janela de leitura aberta (7.056 bases) e uma longa extremidade 3' (1.806 pb) não traduzida. A janela de leitura aberta codifica uma proteína precursora de cadeia única contendo 2.351 aminoácidos, 19 destes correspondentes à sequência de um peptídeo sinal. Durante a passagem da proteína pelo retículo endoplasmático, o peptídeo sinal é clivado resultando em uma proteína de estrutura primária de 2.332 aminoácidos¹⁵. A análise da estrutura primária desta proteína mostrou a presença de domínios: A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2 (Figura 2:4b). O conhecimento da via de síntese intracelular do fator VIII tornou-se possível graças aos estudos com cultura de linhagens

de células de mamíferos, não humanas, transfectadas com o cDNA do fator VIII. A maturação e a secreção do fator recém sintetizado envolvem grande variedade de interações proteína-proteína e diversas modificações pós-traducionais. No retículo endoplasmático, o fator VIII sofre vários eventos de glicosilação para então ser encaminhado para o complexo de Golgi. Neste, a molécula sofrerá processo de sulfatação e glicosilação de resíduos específicos, além de clivagens proteolíticas na junção dos domínios B-A3 e em sítios adicionais dentro do domínio "B". Estas clivagens dividem a molécula de fator VIII em duas porções: (I) cadeia pesada, constituída pelo domínio A1, A2 e fragmentos heterogêneos do domínio B e (II) cadeia leve, constituída pelos domínios A3, C1 e C2, resultando na secreção de um heterodímero dependente de metais bivalentes¹⁶ (Figura 2:4d).

O fator VIII no plasma

Imediatamente após a secreção do fator VIII, o heterodímero interage com o fator de von Willebrand que atua como carreador do fator VIII durante sua circulação no plasma. O fator VIII, ligado ao fator de von Willebrand, terá uma meia vida que varia de 12-15 horas. O fator VIII é ativado pela trombina e pelo fator X. Ambas as proteases clivam a molécula de fator VIII nas posições Arg³⁷² e Arg⁷⁴⁰ da cadeia pesada e Arg¹⁶⁸⁹ da cadeia leve (Figura 2:4e). Essas clivagens resultam em dois fragmentos A1-A2 e A3-C1-C2 que permanecem associados por meio de interações eletrostáticas entre o domínio A1 e A3. A ativação do fator VIII reduz drasticamente a afinidade com o fator de von Willebrand. O fator VIII ativado juntamente com fator IX ativado, fosfolípidos de membrana carregados negativamente e íons cálcio formam o complexo tenase, que por sua vez, atua enzimaticamente sobre o fator X convertendo-o em sua forma ativada. O fator X ativado participa da conversão da protrombina em trombina juntamente com fator V ativado e íons cálcio (complexo protrombinase). A trombina é a enzima chave da cascata de coagulação que, em última instância, converterá fibrinogênio em fibrina. Uma vez que o fator VIII ativado tenha desempenhado seu papel na cascata da coagulação, este é rapidamente inativado. O mecanismo exato desta inativação sob condições fisiológicas ainda é desconhecido. Entretanto, a proteína C ativada cliva a cadeia pesada do fator VIII nas posições Arg³³⁶/Met³³⁷ e Arg⁵⁶²/Gly⁵⁶³ em uma reação que requer a presença de proteína S e a região carboxi-terminal do domínio B do fator V¹⁷⁻¹⁹.

A heterogeneidade das mutações na hemofilia A

Desde a clonagem de F8 em 1984, as bases moleculares da hemofilia A vem sendo extensivamente estudadas. Estes estudos geraram grande volume de informações que hoje são compiladas em bancos de dados acessíveis através da *internet*. Um dos mais representativos bancos de informação sobre hemofilia A é o HAMSTeRS (*Haemophilia A Mutation Search Test and Resource Site*).²⁰ Este banco disponibiliza a listagem completa das mutações publicadas, dados fenotípicos, modelos moleculares, métodos para o rastreamento de mutações, lista de polimorfismos e uma revisão sobre a patologia molecular da hemofilia A. O HAMSTeRS lista atualmente mais de 1.000 mutações associadas à hemofilia A envolvendo substituições,

deleções e inserções distribuídas por todo o gene²¹. Os dados moleculares sobre a hemofilia A demonstram uma grande heterogeneidade de mutações associadas à doença. Entretanto, duas mutações específicas, a Inversão do Intron 22 e a Inversão do Intron 1, são encontradas em cerca de 50% e 5% dos casos de hemofilia A grave, respectivamente²².

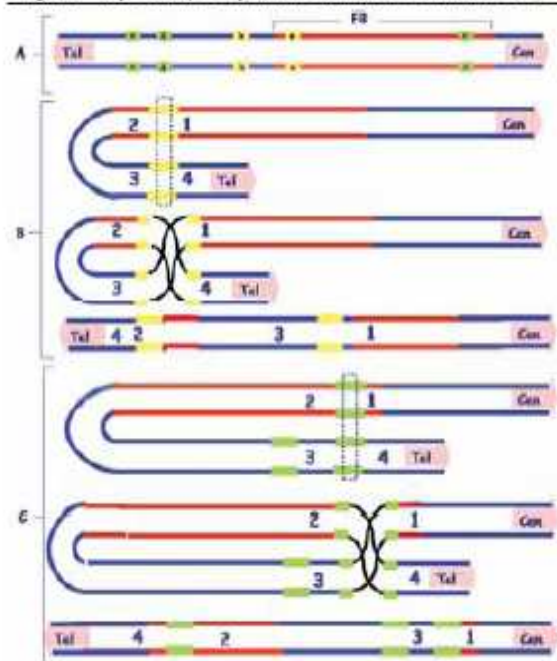
A inversão do intron 22 resulta da recombinação homóloga entre a sequência int22h1 e uma das cópias extragênicas (int22h2 ou int22h3) localizadas a 400-500 kb anteriores à porção telomérica de F8. Dependendo da cópia extragênica envolvida no evento de recombinação, dois tipos principais de inversão são reconhecidos. A inversão do tipo 1 envolve a cópia distal (int22h3) e a inversão do tipo 2 envolve a cópia proximal (int22h2). Estas inversões ocorrem quase exclusivamente na meiose masculina^{23,24} (Figura 3).

A inversão do intron 1 envolve a recombinação homóloga entre uma região de 1.041 pb situada no Intron 1 (int1h1) e uma cópia extragênica (int1h2) situada a aproximadamente a 140 kb anterior da porção telomérica de F8 entre os genes C61A e VBP1. A similaridade entre as sequências int1h1 e int1h2 é muito alta, sendo observada a diferença de um único nucleotídeo entre elas^{25,26} (Figura 3).

Apesar do grande volume de informações sobre as bases moleculares da hemofilia A, existe um percentual de cerca de 2% dos pacientes cujo diagnóstico molecular não é estabelecido, mesmo usando as abordagens mais avançadas para a análise do gene. Isto pode ser decorrente de mutações que estão presentes em regiões não codificadoras ou que estes pacientes não possuem mutação associada ao F8. É possível que haja participação de outros genes, por exemplo, no caso dos genes LMAN1 (do Inglês, *lectin, manose binding 1*, também conhecida como ERGIC53) e MCFD2 (do Inglês, *multiple coagulation factor deficiency 2 protein*) responsáveis pelo transporte intracelular do fator VIII do retículo endoplasmático para o aparato de Golgi. Defeitos destas proteínas resultam em deficiência combinada de fatores V e VIII da coagulação²⁷.

Diversas proteínas interagem com o fator VIII na circulação. Uma das mais importantes é o fator de von Willebrand. O fator de von Willebrand é uma glicoproteína multimérica que desempenha dois principais papéis na hemostasia: (I) ela participa da hemostasia primária quando atua como um mediador para a interação entre as glicoproteínas da superfície plaquetária e a parede do endotélio, no sítio de lesão vascular e, (II) participa da hemostasia secundária quando atua como proteína carreadora do fator VIII, aumentando a meia vida deste.²⁸ Considerando seu papel na hemostasia secundária, é fácil compreender que a deficiência de fator de von Willebrand resulta em uma correspondente diminuição dos níveis de fator VIII e em quadros clínicos similares àqueles observados em pacientes com hemofilia A. Dos diversos subtipos clínicos da doença de von Willebrand (tipos 1, 2A, 2B, 2M, 2N), a variante 2N é a única que decorre da redução da interação entre fator von Willebrand e fator VIII devido a mutações nos domínios D' ou D3 daquele fator²⁹. Homozigotos ou heterozigotos compostos, para essa condição, apresentam redução dos níveis de fator VIII no plasma e, geralmente, apresentam eventos hemorrágicos, que muitas vezes são erroneamente diagnosticados como hemofilia A. A análise desta variante é importante, sobretudo em

Figura 3 - Representação esquemática da inversão dos introns 1 e 22



A. Representação esquemática de F8 juntamente com a porção telomérica do cromossomo X. No esquema, as regiões em cor amarelo e verde são regiões de alta similaridade presentes dentro e fora de F8. "a" e "b" representam respectivamente as cópias int1h-1 e int1h-2 enquanto "c", "d" e "e" representam respectivamente as cópias de int22h-1, int22h-2 e int22h-3. Representação esquemática do mecanismo da inversão do intron 1. C. Representação esquemática do mecanismo de inversão do intron 22. Abreviações: tel, telômero; cen, centrômero.

pacientes cuja análise molecular para hemofilia A mostrou-se negativa para mutações em F8³⁰. Outra questão a ser pontuada quanto a mutações em outros genes diz respeito a fatores que podem influenciar o fenótipo da hemofilia. Trabalhos recentes mostraram que, mesmo pacientes que apresentam a mesma mutação e com níveis residuais de fator VIII similares, podem apresentar variações quanto ao padrão de manifestações hemorrágicas. Dentre as explicações para a variabilidade fenotípica destaca-se a presença das mutações protrombóticas, tais como o fator V Leiden, mutações no gene da protrombina, (G20210A), no gene da metilenetetraidrofolato redutase, deficiência de proteína C e proteína S, ou mesmo co-herança de polimorfismos que afetam o sistema de coagulação. Há ainda trabalhos recentes que associam a variabilidade fenotípica a diferenças da farmacocinética do fator VIII infundido nos pacientes. Estes fatores podem minimizar a gravidade clínica da hemofilia A^{31,32}.

O diagnóstico molecular da hemofilia A

A história familiar e a ocorrência de episódios hemorrágicos são os principais dados para o diagnóstico da hemofilia. Entretanto, cerca de 20%-30% dos pacientes com hemofilia não apresentam história familiar da doença. A disponibilidade de técnicas moleculares acrescentou, ao diagnóstico laboratorial da hemofilia, a possibilidade de caracterizar a doença em nível

molecular. A análise molecular pode utilizar tanto DNA ou RNA, embora o primeiro seja mais utilizado em função de sua maior estabilidade e facilidade de manuseio. As abordagens utilizadas para a análise do DNA podem ser diretas ou indiretas. As abordagens indiretas são baseadas em análise de ligação e empregam marcadores polimórficos específicos. As abordagens diretas são baseadas em diversas técnicas moleculares que permitem a identificação precisa da mutação. Entretanto, apresentam como dificuldade o extenso tamanho de F8, a complexidade genômica do mesmo e a grande diversidade de mutações. Mutações envolvendo grandes sequências de DNA, isto é, grandes deleções, inserções ou rearranjos podem ser identificadas por meio de análise de *Southern blotting*³³. Para a detecção da inversão do Intron 22, vêm sendo utilizadas as técnicas de PCR longa propostas por Liu et al.³⁴, e, mais recentemente, uma técnica de PCR multiplex proposta por Rossetti et al.³⁵ Mutações envolvendo pequenas alterações na sequência de DNA (em geral, mutações em ponto) requerem procedimentos técnicos especiais. Para tal, utiliza-se a amplificação por PCR, seguida de um ensaio de mobilidade eletroforética (DGGE - *Denaturing Gradient Gel electrophoresis*, SSCP - *Single Strand Conformation Polymorphism*, CSGE - *Conformation Sensitive Gel Electrophoresis*, DHPLC - *Denaturing High Performance Liquid Chromatography*, e CCMA - *Chemical Cleavage Mismatch Analysis*) e/ou de sequenciamento³⁶⁻³⁷. De modo geral, as taxas de detecção de mutações obtidas com estes ensaios são bastante elevadas e têm sido aperfeiçoadas mediante adequação de protocolos.

Implicações clínicas do diagnóstico molecular das hemofilias

Em geral, a caracterização molecular da hemofilia A não é necessária para o diagnóstico da doença, nem para o seu tratamento. O diagnóstico da hemofilia é suscitado clinicamente e confirmado através da realização do teste de FVIII:C. O tratamento é realizado através de infusão do fator deficiente de forma profilática ou sob demanda. Entretanto, o diagnóstico molecular das hemofilias é altamente relevante para a identificação de portadoras, naquelas situações em que a condição é possível, mas não obrigatória (filhas de mulher portadora) ou, ainda, naqueles casos em que, embora não exista história familiar prévia de hemofilia, ocorreu nascimento de indivíduo com a doença. Nestas situações, a identificação da condição de portadora é fundamental, particularmente em mulheres em idade fértil, pois permite que a mulher possa participar e decidir sobre o planejamento de sua família. Enfim, o diagnóstico molecular das hemofilias permite estruturar um programa de aconselhamento genético/orientação familiar que permite determinar com precisão a condição genética da doença (hereditária ou esporádica). Os dados advindos dessa determinação disponibilizam potenciais informações quanto às características da doença, riscos de recorrência, modalidades de transmissão genética, arsenal diagnóstico pré e pós-natal assim como suporte psicológico e emocional^{38,39}.

O diagnóstico molecular das hemofilias tem importância prática no diagnóstico pré-natal em países onde o abortamento de indivíduos afetados por doenças graves é legal. Esta situação não é permitida no Brasil, tornando seu uso limitado para esta indicação. Uma das complicações mais temíveis da hemofilia A

é o desenvolvimento de inibidores de fator VIII (aloanticorpos), que ocorre em 10%-30% dos pacientes. Pacientes com inibidor tornam-se refratários a infusão de fator VIII, apresentam hemorragias mais frequentes e/ou mais graves e necessitam tratamento com produtos mais onerosos. Em aproximadamente 95% dos casos, o desenvolvimento de inibidor ocorre nos primeiros 50 dias de infusão do concentrado. O único tratamento capaz de erradicar inibidores em hemofilia é a imunotolerância, que consiste na infusão frequente de concentrado de fator VIII, com fins de "tolerizar" o paciente. Estudos correlacionando o desenvolvimento de inibidores e os tipos de mutação demonstraram que mutações com troca de aminoácidos e pequenas deleções exibiram baixa prevalência de inibidores (cerca de 5%). Em contraste, grandes deleções, mutações sem sentido e a prevalente inversão do Intron 22 se associaram a maior prevalência (7-10 vezes) de inibidores (cerca de 35%).⁴⁰ Resultados semelhantes foram demonstrados por Goodeve e Peake⁴¹ ao estabelecerem a correlação entre genótipo e fenótipo e o desenvolvimento de inibidores. É possível que pacientes com mutações de troca de sentido sejam capazes de sintetizar fator VIII endógeno, que, embora não funcional, seria suficiente para induzir a imunotolerância para o fator VIII exógeno. Em contraste, quantidades mínimas de fator VIII endógeno são sintetizadas em pacientes com defeitos moleculares graves e o fator VIII exógeno representaria, portanto, uma proteína estranha que desencadearia uma resposta imune⁴⁰. Ainda, mutações na cadeia leve do fator VIII parecem conferir maior risco de inibidores do que mutações na cadeia pesada⁴². A maioria dos inibidores em pacientes com hemofilia A leve/moderada ocorre em associação com mutações com sentido trocado nos domínios A1-A2 (entre os resíduos 482-501) e na junção C1-C2 do fator VIII. Estas mutações estão associadas a risco aumentado de inibidor em até 50%, possivelmente ocasionado por mudança conformacional da proteína^{43,44}. Em particular, algumas mutações se encontram mais comumente associadas ao desenvolvimento de inibidor em hemofilia A leve/moderada: Arg593Cys, Arg2150His e Trp2229Cys.⁴⁵ Em pacientes com hemofilia A leve/moderada e mutações de risco para desenvolvimento de inibidores, recomenda-se tratar os eventos hemorrágicos com desmopressina sempre que possível a fim de minimizar as infusões de concentrado de fator VIII, reduzindo, assim, o risco de desenvolvimento de inibidor. Ainda, diante de mutações de risco, recomenda-se testar o paciente para a presença do inibidor mais frequentemente, particularmente até a 50ª infusão. Um estudo recente revelou que pacientes com hemofilia A e inibidor, tratados com imunotolerância, que apresentam grandes deleções de F8, apresentam resposta pior em comparação com outros tipos de mutação⁴⁶. O estudo de mutações naturais pode levar a uma compreensão mais clara das relações estrutural-funcionais de diversas proteínas. Este aprendizado não é diferente com relação ao fator VIII, uma vez que a caracterização de diversas mutações tem ocasionado uma melhor compreensão das relações F8-fator VIII^{47,48}.

Por último, o diagnóstico molecular da hemofilia A é fundamental para o aconselhamento genético. Especialmente em casos esporádicos, sem história familiar prévia da doença, somente o conhecimento da mutação, associada pode reconhecer a condição de portadora e prever com precisão o risco de

recorrência da doença na futura prole. Ainda, o conhecimento do genótipo pode trazer vantagens na predição do risco de desenvolvimento de inibidores, possivelmente do sucesso da imunotolerância e, no futuro, para terapia gênica. Recomenda-se que o diagnóstico molecular da hemofilia A seja realizado em todos os pacientes acometidos pela doença. Em países desenvolvidos, o teste é ofertado a todos os pacientes com hemofilia ao diagnóstico, embora não seja ainda de rotina no Brasil.

FINANCIAMENTO

Fundação de Amparo À Pesquisa do Estado de Minas (FAPEMIG)

SUMMARY

Hemophilias are bleeding disorders due to deficiency of the blood coagulation factor VIII (hemophilia A) or factor IX (hemophilia B), resulting from mutation on the gene coding for factor VIII or factor IX. Hemophilia A is more frequent than hemophilia B and affects 1:10,000 male newborns. The severity and frequency of hemorrhagic episodes is related to residual activity of factor VIII present in the plasma and relates to the type of mutation associated with the disorder. Cloning of the factor VIII gene has enabled researchers to better understand the molecular basis of hemophilia A, accounting to date, for more than 1,000 mutations associated with the disease. This comprehensive knowledge permits an improved comprehension of the genotype-phenotype relation, establishment of clinical policies when mutations related to higher risk of inhibitors development are known, identification of hemophilia carriers in case of women related to patients, implementation of a program of genetic counseling and discovery of structural-functional relationship between gene-protein. This article aims to review the molecular basis of hemophilia A, laboratory techniques used to characterize mutations and clinical implications involved in the molecular diagnosis of hemophilia A. [Rev Assoc Med Bras 2009; 55(2): 213-9]

KEY WORDS: Hemophilia A. Mutation. Molecular diagnosis. Carrier detection. Genes. Factor VIII.

REFERÊNCIAS

1. Hirsh J, Weitz JI. Thrombosis and anticoagulation. *Semin Hematol.* 1999;4(Suppl 7):118-32.
2. DiMichele D, Neufeld EJ. Hemophilia. A new approach to an old disease. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1998;12(6): 1315-1344.
3. Mannucci PM, Tuddenham EG. The hemophilias: progress and problems. *Semin Hematol.* 1999;36(4 Suppl 7):104-17.
4. Bolton-Maggs PH, Pasi KJ. Haemophilias A and B. *Lancet.* 2003; 361:1801-1809.
5. Hedner U, Ginsburg D, Lusher JM, High KA. Congenital hemorrhagic disorders: new insights into the pathophysiology and treatment of hemophilia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2000;241-65.
6. White GC, Rosendaal F, Aledor LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J. International Society on Thrombosis and Haemostasis: Subcommittee on factor VIII and Factor IX of the Scientific and Standardization; 2000.
7. Graw J, Brackmann H, Oldenburg J, Schenepfeim R, Spannag M, Schwaab R. *Nat Rev Genet.* 2005;6:488-501.
8. Cohen AJ, Kessler CM. Treatment of inherited coagulation disorders. *Am J Med.* 1995;99:675-682.
9. Soares RPS, Chamone DAF, Bydlowski SP. Factor VIII gene inversion and polymorphism in Brazilian patients with haemophilia A: carrier detection and prenatal diagnosis. *Haemophilia.* 2001;7:299-305.

10. Gitschier J, Wood WI, Goralka, TM, Wion, KL, Chen, EY, Eaton DH, et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature.* 1984;312:326-30.
11. Oldenburg J, Brackmann H, Hanfland P, Schwaab R. Molecular genetics in hemophilia A. *Vox Sang.* 2000;78(Suppl 2):33-8.
12. Brinke A, Tagliavacca L, Naylor J, Green PG, Giannelli F. Two chimaeric transcription units result from an inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene and a region reportedly affected by reciprocal translocations in T-cell leukaemia. *Hum Mol Genet.* 1996;5:1945-51.
13. Antonarakis SE. Molecular genetics of coagulation factor VIII gene and haemophilia A. *Haemophilia.* 1998;4(Suppl 2):1-11.
14. Bowen DJ. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Mol Pathol.* 2002;55:127-44.
15. Wood WI, Capon DJ, Simonsen CC, Eaton DL, Gitschier J, Keyt, B, et al. Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature.* 1984;312(5992):330-3.
16. Scheiflinger F, Damer F. Recent advances in the understanding of the molecular biology of hemophilia A: possible implications toward a more effective therapeutic regime. *Wien Klin Wochenschr.* 1999;115:172-80.
17. Ananyeva NM, Koliavskaia DV, Shima M, Saenko EL. Catabolism of the coagulation factor VIII: can we prolong lifetime of FVIII in circulation? *Trends Cardiovasc Med.* 2001;11:251-7.
18. Saenko EL, Ananyeva NM, Tuddenham EGD, Kember-Cook G. Factor VIII- novel insights into form and function. *Br J Haematol.* 2002;119:323-31.
19. Rezende SM, Simmonds R E, Lane D.A. Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex. *Blood.* 2004;103:1192-201.
20. HAMSTeR. Haemophilia A mutation search test and resource site. [cited 2008]. Available from: <http://europium.mrc.rpms.ac.uk/>.
21. Kember-Cook G, Tuddenham EGD, Wacey AI. The factor VIII Structure and Mutation Resource Site: HAMSTeRS version 4. *Nucleic Acids Res.* 1998;26(1):216-9.
22. Andrikovics H, Klein I, Bors A, Nemes L, Marosi A, Váradi A, Tordai A. Analysis of structural changes of the factor VIII gene, involving intron 1 and 22, in severe hemophilia A. *Haematologica.* 2003;88:778-84.
23. Lakich D, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet.* 1993;5:236-41.
24. Rossiter JP, Young M, Kimberland ML, Hutter P, Ketterling RP, Gitschier J, et al. Factor VIII gene inversion causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. *Hum Mol Genet.* 1994;7:1035-9.
25. Brinke A, Tagliavacca L, Naylor J, Green PG, Giannelli F. Two chimaeric transcription units result from an inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene and a region reportedly affected by reciprocal translocations in T-cell leukaemia. *Hum Mol Genet.* 1996;12:1945-51.
26. Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood.* 2002;99:168-74.
27. Zhang B, Ginsburg D. Familial multiple coagulation factor deficiencies: new biologic insight from rare genetic bleeding disorders. *J Thromb Haemost.* 2004;2:1564-72.
28. De Wit TR, Van Mounik JA. Biosynthesis, processing and secretion of von Willebrand factor: biological implications. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2001;14:241-55.
29. Mazurier C, Hilbert L. Type 2N von Willebrand disease. *Curr Hematol Rep.* 2005;4:350-8.
30. Schneppenheim R, Budde U, Krey S, Drewke E, Bergmann F, Lechler E, Oldenburg J, Schwaab R. Results of a screening for von Willebrand disease type 2N in patients with suspected haemophilia A or von Willebrand disease type 1. *Thromb Haemost.* 1996;76:598-602.
31. Dargaud Y, Meunier S, Negrier C. Haemophilia and thrombophilia: an unexpected association! *Haemophilia.* 2004;10:319-26.
32. Van Dijk K, Van Der Bom JG, Lenting PJ, De Groot PG, Mauser-Bunschoten EP, Rosendaal G, et al. HM. Factor VIII half-life and clinical phenotype of severe hemophilia A. *Haematologica.* 2005;90:494-8.
33. Saweck J, Skulimowska J, Windyga J, Lopaciuk S, Koscielak J. Prevalence of the intron 22 inversion of the factor VIII gene and inhibitor development in polish patients with severe hemophilia A. *Arch Immunol Ther Exp.* 2005;53:352-6.
34. Liu Q, Nozari G, Sommer SS. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A. *Blood.* 1999;92:1459-9.
35. Rossetti LC, Radic CP, Larriva IB, De Brasi CD. Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR. *Clin Chem.* 2005;51:1154-8.
36. Goodeve AC. Laboratory methods for the genetic diagnosis of bleeding disorders. *Clin Lab Haematol.* 1999;20:3-19.
37. Vidal F, Farsnac, E, Altisent C, Puig L, Gallardo D. Rapid hemophilia A molecular diagnosis by a simple DNA sequencing procedure: identification of 14 novel mutations. *Thromb Haemost.* 2001;85:580-3.
38. Tagariello G, Belvoni D, Salviato R, Are A, De Biasi E, Goodeve A, et al. Experience of a single Italian center in genetic counseling for hemophilia: from linkage analysis to molecular diagnosis. *Haematologica.* 2000;85:525-9.

39. Miller R. Counseling about diagnosis and inheritance of genetic bleeding disorders: Haemophilia A and B. *Hemophilia*. 1999;5:77-83.
40. Oldenburg J, Brackmann H, Schwaa, R. Risk factor for inhibitor development in hemophilia A. *Haematologica*. 2000;85(Suppl 10):7-17.
41. Goodeve A, Peake IR. The molecular basis hemophilia a: genotype-phenotype relationships and inhibitor development. *Semin Thromb Hemost*. 2003;29:23-30.
42. Goodeve A. The incidence of inhibitor development according to specific mutations and treatment. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2003;14 (Suppl 1):17-21.
43. Oldenburg J, Picard JK, Schwaab R, Brackmann HH, Tuddenham EG, Simpson E. HLA Genotype of patients with severe haemophilia A due to intron 22 inversion with and without inhibitors of factor VIII. *Thromb Haemost*. 1997;77:238-42.
44. Hay CR. Factor VIII inhibitors in mild and moderate-severity haemophilia A. *Haemophilia*. 1998;4(4):558-63.
45. Hay CR, Ludlam CA, Colvin BT, Hill FG, Preston FE, Wasseem N, et al. Factor VIII inhibitors in mild and moderate-severity haemophilia A. *Thromb Haemost*. 1998;79:762-6.
46. Salvato R, Belvini D, Radossi P, Sartori R, Pierobon F, Zanotto D, et al. F8 gene mutation profile and ITT response in a cohort of Italian haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia*. 2007;13:361-72.
47. Spiegel PC, Murphy P, Stoddard BL. Surface-exposed hemophilic mutations across the factor VIII C2 domain have variable effects on stability and binding activities. *J Biol Chem*. 2004;279:53691-8.
48. Harbat D, Kalabova D, Novotny M, Vorlova Z. Thirty four novel mutation detected in factor VIII gene by multiplex CSGE: modeling of 13 novel aminoacid substitutions. *J Thromb Haemost*. 2003;1(4):773-81.

Artigo recebido: 24/03/08
Aceito para publicação: 01/07/08



LETTER TO THE EDITOR

Detection of *int1h*-related inversion of the factor VIII gene

S. F. PIO,* C. MÜHLE,† G. C. DE OLIVEIRA‡ and S. M. REZENDE§

*Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; †Department of Psychiatry and Psychotherapy, University of Erlangen-Nuernberg, Germany and Department of Pediatrics, Medical University of Innsbruck, Austria; ‡CEBio and Genomics and Computational Biology Group, Centro de Pesquisa René Rachow, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; and §Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

The *int1h* related inversion of the factor (F) VIII gene (*F8*) is a recurrent causative mutation found in up to 5% of patients with severe haemophilia A (HA). It was first reported by Brinke *et al.* [1], while studying two haemophilic monozygotic twins. They discovered that an inversion disrupted the *F8* at intron 1 and resulted in the production of two chimeric mRNAs. Bagnall *et al.* [2], demonstrated that this

inversion was derived from a homologous recombination between two nearly identical 1,041 base pair (bp) sequences. These are *int1b-1* (NCBI Reference Sequence: NT_167198.1, nr 5.152320–5.153360) and *int1b-2* (NCBI Reference Sequence: NT_167198.1, nr 5.293994–5.295034) located in opposite orientation. These sequences were positioned, respectively, in the intron 1 and in a more telomeric region,

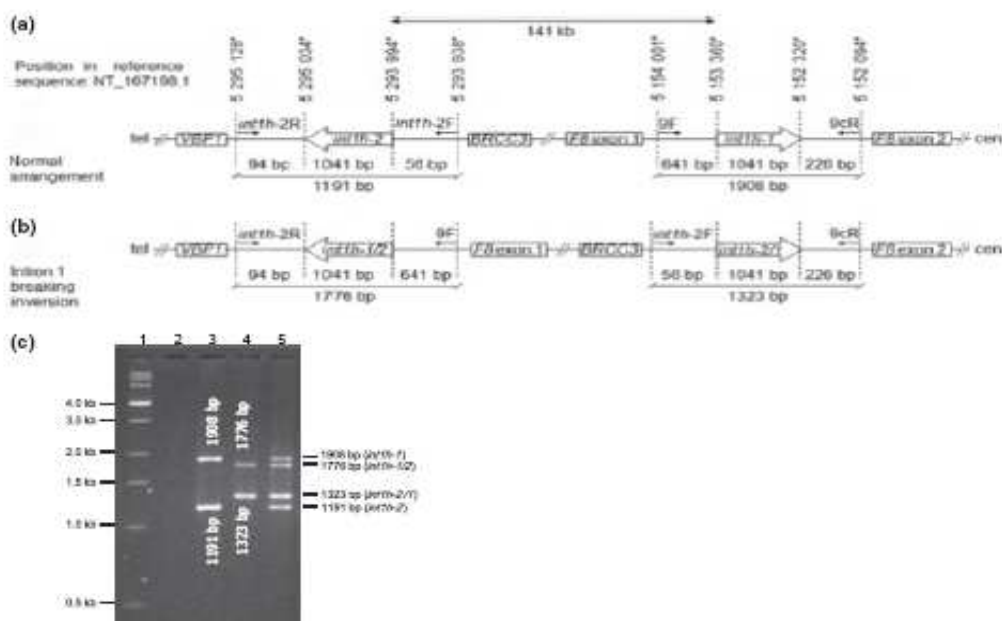


Fig. 1. Schematic representation of the location of *int1b-1* and *int1b-2* within the Xq28 region and agarose gel electrophoresis of polymerase chain reaction (PCR) products detecting the intron 1 inversion. (a) Sequence reference number NT_167198.1 with the normal situation (without the intron 1 breaking inversion) and normal position of oligonucleotides that amplify *int1b-1* and *int1b-2*. The numbers with * show the exact position of the oligonucleotides, *int1b-1* and *int1b-2* in the reference sequence. (b) Illustrates the occurrence of the intron 1 breaking inversion and shows the new arrangement of oligonucleotides 9F and *int1b-2-2E*. (c) 1.5% agarose gel electrophoresis showing fragments derived from amplification of intron 1 regions. 1, DNA ladder; 2, negative control; 3, normal individual with expected intron 1 fragments; 4, patient with haemophilia attributed to the intron 1 breaking inversion; 5, haemophilia carrier with intron 1 breaking inversion. bp, base pairs; kb, kilobase pair; cen, centromer, tel, telomere. The scheme is not drawn to scale.

Correspondence: Suelly Meireles Rezende, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Alfredo Balena, 190 – 2nd floor – room 243, ZIP 30130-110, Belo Horizonte – Minas Gerais – Brazil. Tel/fax: +55 31 34099746/45; e-mail: srezen@medicina.ufmg.br

Accepted after revision 29 July 2010

141 kilobases (kb) upstream of *F8*, between the *BRCC3* (BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 3) and *VBPI* (von Hippel-Lindal binding protein 1) genes (Fig. 1a). Bagnall *et al.* also developed a formidable procedure of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of these mutations in both patients and carriers [2]. Since then, the test for Inv1 of *F8* has become a standard protocol for the molecular analysis of severe haemophilia A.

2 LETTER TO THE EDITOR

In the original article, Bagnall *et al.* reported that the two suggested amplified fragments would result in bands of 1.5 kb for *int1b-1* and 1 kb for *int1b-2* in normal individuals, whereas in patients carrying the intron 1 breaking inversion the pattern would be reversed: the first reaction yields a product of 1.0 kb whereas the second set of primers amplifies a 1.5 kb fragment. However, analysis of the exact location of the oligonucleotides used by Bagnall *et al.* in the published genome (NCBI Reference Sequence: NT_167198.1) predicts a different pattern with four distinct product sizes for primers combinations. In the absence of an inversion, primers specific for *int1b-1* (9F, 9cR) and the primer *int1b-2F* yield a 1,908 bp product while primers specific for *int1b-2* (*int1b-2F*, *int1b-2R*) and the primer 9F yield a 1,191 bp band (Fig. 1a and c). If an intron 1 breaking inversion is present, primers specific for *int1b-1* (9F, 9cR) and the primer *int1b-2F* give rise to a product of 1,323 bp; primers specific for *int1b-2* (*int1b-2F*, *int1b-2R*) and the primer 9F amplify a fragment of 1,776 bp (Fig. 1b and c). In the case of carriers, all the four fragments, 1,908, 1,776, 1,323 and 1,191 bp, are found after both reactions.

Although several studies have already published amplification pattern different to those presented by Bagnall *et al.* [3], other even

recent publications [4] are still repeating the erroneous pattern of amplification described by Bagnall *et al.* We believed that this overlap of results to detect the Inv1 may bring differences in the analysis, especially when aberrant patterns, such as the ones recently reported in congress presentations [5], are investigated. Reporting the exact and correct size of PCR products and, if possible, providing the sequence of unusual fragments would greatly facilitate research into molecular events underlying such recurrent and abnormal inversions and the identification of possible common mechanisms.

Acknowledgment

This work was funded by FAPEMIG.

Disclosures

The authors stated that they had no interests which might be perceived as posing a conflict or bias.

References

- 1 Brinke A, Tagliavacca L, Naylor J, Green P, Giangrande P, Giannelli F. Two chimaeric transcription units result from an inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene and a region reportedly affected by reciprocal translocations in T-cell leukaemia. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1945-51.
- 2 Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood* 2002; 99: 168-74.
- 3 Tizzano EF, Cornet M, Baiget M. Inversion of intron 1 of the factor VIII gene for direct molecular diagnosis of hemophilia A. *Haematologica* 2003; 88: 118-20.
- 4 Sukarova Stefanovska E, Dejanova V, Tchakarova P, Petkov G, Efremov GD. Genetic inversions among hemophilia A patients from Macedonia and Bulgaria. *Acta Haematol* 2008; 120: 192-4.
- 5 Bador M, Pellechia D, Freigay M *et al.* Unusual intron 1 inversion with concomitant large duplication within the F8 gene in a severe hemophilia A patient [abstract]. *J. Thromb Haemost* 2009; 7(suppl 2): 807. Jul Abstract PP-WE-533.



LETTER TO THE EDITOR

An aberrant pattern for intron 1 inversion of factor VIII gene

S. F. PIO,* G. C. OLIVEIRA,† S. SOARES‡ and S. M. REZENDE§

*Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; †Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; ‡Hemocentro de Uberaba, Fundação HEMOMINAS, Minas Gerais, Brazil; and §Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Haemophilia A (HA) is a bleeding disorder resulting from partial or complete deficiency of blood coagulation factor VIII (FVIII). This X-linked disorder is caused by a variety of mutations distributed throughout the factor VIII gene (*F8*). Among these mutations, inversions of intron 1 and 22 (*Inv1* and *Inv22*) arise from recombination between nearly identical sequences [1–3]. In most studies, the prevalence of *Inv1* and *Inv22* in patients with severe HA ranges from 0–5% and 40–50%, respectively [4]. In the case of *Inv1*, it results from a homologous recombination between two nearly identical sequences of 1041 base pairs (bp), *int1b-1* (NCBI Reference Sequence: NT_167198.1, nt 5.152320–5.153360) and *int1b-2* (NCBI Reference

Sequence:NT_167198.1, nt 5.293994 – 5.295034), positioned in intron 1 of *F8* and in a more telomeric region located about 140 kilobases upstream, respectively. *Inv1* detection became a useful first line test in the molecular analysis of patients with severe HA, along with testing for *Inv22*. The test consists of two reactions: (i) amplification of *int1b-1* using primers 9F, 9cR and *int1b-2*F and (ii) amplification of *int1b-2* with primers *int1b-2*F, *int1b-2*R and 9F [4]. By using the oligonucleotides proposed by Bagnall et al., the following fragments are identified: if inversion is absent, the regions *int1b-1* and *int1b-2* yield fragments of 1,908 bp and 1,191 bp, respectively; if inversion is present, the hybrid regions *int1b-1/2* and *int1b-2/1* yield

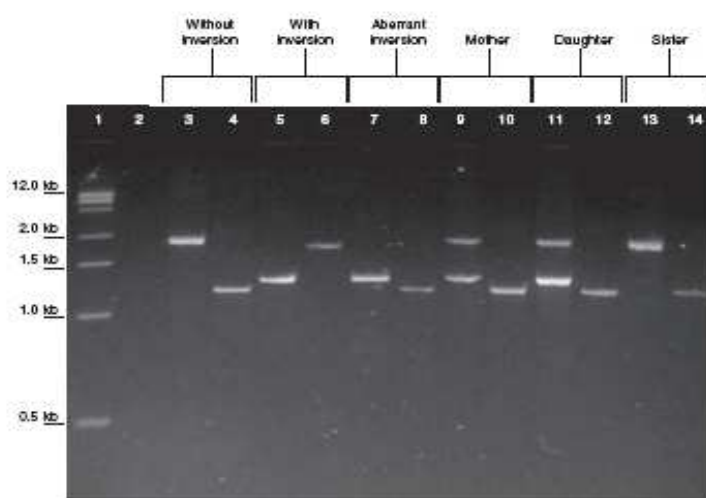


Fig. 1. Lane 1, DNA ladder; lane 2, negative control; lane 3, *int1b-1* of a patient without *Inv1* showing fragment of 1,908 bp; lane 4, *int1b-2* of a patient without *Inv1* showing fragment of 1,191 bp; lane 5, *int1b-1* of a patient with *Inv1* showing fragment of 1,323 bp; lane 6, *int1b-2* of a patient with *Inv1* showing fragment of 1,776 bp; lane 7, *int1b-1* of the proband with aberrant inversion showing fragment of 1,191 bp; lane 8, *int1b-2* of the proband with aberrant inversion showing fragment of 1,323 bp; lane 9, *int1b-1* of the proband's mother showing fragments of 1,908 bp and 1,323 bp; lane 10, *int1b-2* of the proband's mother showing fragment of 1,191 bp; lane 11, *int1b-1* of the proband's daughter showing fragments of 1,908 bp and 1,323 bp; lane 12, *int1b-2* of proband's daughter showing fragment of 1,191 bp; lane 13, *int1b-1* of proband's sister showing fragments of 1,908 bp; lane 14, *int1b-2* of proband's sister showing fragment of 1,191 bp. Abbreviations: bp, base pairs; Kb, kilobase pair.

fragments of 1,776 bp and 1,323 bp, respectively (Fig. 1). Carriers present fragments of 1,908, 1,776, 1,323 and 1,191 bp, according to the heterozygote pattern.

We analysed a group of 150 patients with severe HA (FVIII:C < 1%) from a single centre for the presence of *Inv1*. Among eight patients with *Inv1*, we found one patient with an aberrant band pattern. We investigated the pattern of amplification in this patient and also analysed the presence of *Inv1* in his family members. The abnormal

Correspondence: Suely Meireles Rezende, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Alfredo Balena, 190 – 2nd floor – room 243, ZIP 30130-110, Belo Horizonte – Minas Gerais – Brazil. Tel./fax: +55 31 34099746/45; e-mail: srezende@medicina.ufmg.br

Accepted after revision 3 November 2010

2 LETTER TO THE EDITOR

pattern of Inv1 in the proband showed that the PCR for *int1b-1* yielded one fragment of 1,323 bp (corresponding to the hybrid *int1b-2/1* indicating an inversion) and PCR for *int1b-2* yielded one fragment of 1,191 bp (corresponding to the normal *int1b-2*). The 1,323bp fragment resulted from the combination of oligonucleotides Int1h-2F/9cR and the fragment of 1,191 bp resulted from the combination of oligonucleotides Int1h-2R/2F. According to information from the mother, she had two children with haemophilia, establishing a condition of obligate carrier of haemophilia A. When we performed the test with usual combinations of oligonucleotides, 9F-int1h-2F-9cR (reaction 1) and 9F-int1h-2F-int1h-2R (reaction 2) for analysis of family members, we found that the proband's mother and daughter were carriers of the same genetic pattern as the proband while the proband's sister did not show Inv1 (Fig. 1).

To our knowledge, this is the first report describing this aberrant band pattern. Sukarova et al. reported two cases with an abnormal Inv1 pattern in Macedônia which, however, was different from the one reported here [5]. Preliminary experiments suggest that the defect

reported here is due to the presence of an extra *int1b* copy, mediating the recombination event.

In conclusion, we present the case of a patient with severe HA with an aberrant pattern of Inv1 not reported to date. This case confirms the importance of detecting the Inv1 and illustrates the complex molecular mechanisms associated with HA.

Funding

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Disclosures

The authors stated that they had no interests which might be perceived as posing a conflict or bias.

References

- 1 Brinke A, Tagliavacca L, Naylor J, Green P, Giangrande P, Giannelli F. Two chimeric transcription units result from an inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene and a region reportedly affected by reciprocal translocations in T-cell leukaemia. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1945-51.
- 2 Lakich D, Kazazian HJ, Antonarakis S, Ganchier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet* 1993; 5: 236-41.
- 3 Naylor J, Brinke A, Hassock S, Green P, Giannelli F. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1773-8.
- 4 Baguill R, Waseem N, Green P, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood* 2002; 99: 168-74.
- 5 Sukarova Stefanovska E, Dejanova V, Tcharakova P, Perkov G, Efremov G. Genetic inversions among hemophilia A patients from Macedonia and Bulgaria. *Acta Haematol* 2008; 120: 192-4.

4.4 Pio SF, Ozelo MC, Santos A, Zouain D, Oliveira GC, Rezende SM. The long-term course of factor VIII inhibitors in patients with congenital severe hemophilia A and its relation to genotype (Em redação)

The long-term course of factor VIII inhibitors in patients with congenital severe hemophilia A and its relation to genotype
(In preparation)

Simone F Pio¹, Margareth C Ozelo², Andrey Santos², Denise Zouain³, Guilherme C. Oliveira⁴, and Suely M. Rezende⁵.

1-Hematology Laboratory, FHEMIG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

2- Hemocentro da UNICAMP, Campinas, São Paulo

3-Foundation Center of Hematology and Hemotherapy of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

4- Genomic and Computacional Biology Group CEBIO, René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

5-Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Funding: This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

Key words: hemophilia A, mutation, inhibitor, factor VIII, gene.

Scientific category: Original article

Corresponding author
Suely Meireles Rezende
Faculdade de Medicina
Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Alfredo Balena, 190 – 2nd floor – room 243
ZIP 30130-110
Belo Horizonte – Minas Gerais – BRAZIL
Phone/Fax: +55 31 34099746/45
E-mail: srezende@medicina.ufmg.br

Abstract

Hemophilia A (HA) is an X-linked inherited bleeding disorder of variable clinical severity and presentation, caused by decreased activity of factor VIII (FVIII) due to heterogeneous mutations in the coding gene (*F8*). The formation of inhibitory alloantibodies is, in the postinfectious era, the most severe and costly complication of replacement therapy in patients with HA. In order to investigate whether the development and long-term course of inhibitors is associated with *F8* genotype, we studied a cohort of patients with severe HA from two Brazilian centers. We also investigated the association of serological profile for viral diseases with the presence or absence of inhibitors. The population studied consisted of 90 patients and their genotype was characterized as: intron 1 inversion (INV1) (n = 8), intron 22 inversion (INV22) (n = 56), frameshift mutations (c.3134_3135insC, c.6876_6877insT, c.2295_2296del, c.2962_2963insGT, c.1233_1234insT, c.4866_4868 del) (n=7), nonsense mutations (c.3981G>T, c.88G>T, c.2440C>T, c.2344G>T, c.5878C>T, c.5032C>T, c.3119T>G, c.2372G>A, c.6496C>T, c.1063C>T) (n =16) and missense mutations (c.6046C>T, c.901C>T)(n = 3). Ten mutations (c.3134_3135insC, c.6876_6877insT, c.3982C>T, c.3780C>G, c.2295_2296del, c.2962_2963insGT, c.1233_1234insT, c.2344G>T, c.3119T>G, c.5032C>T) are new mutations. Inhibitor data was available for 75/90 patients (83%). Statistical analysis revealed no association between the different groups of mutation (INV 1 and 22, nonsense, missense and frameshift) and the development of persistent inhibitors ($p > 0.05$). Also, there was no association between any of the different serological tests and the development of persistent inhibitors ($p > 0.05$). Our results demonstrate that the development of persistent inhibitors in severe HA is not associated with a particular category of *F8* mutation and that other genetic and/or non-genetic risk factors are involved in inhibitor development.

Introduction

Hemophilia A (HA) is an X-linked inherited bleeding disorder caused by decreased activity of factor VIII (FVIII) due to heterogeneous mutations in the coding gene (*F8*). HA is one of the most common severe hereditary bleeding disorders in humans, and has an estimated prevalence of 1 in 5000-10.000 male newborns(1). The *F8* is 186 Kb in size and has 26 exons (approximately 9 Kb cDNA) encoding a protein of 2332 amino acids. It consists of five domains, three homologous A domains, one B domain and two C domains(2). FVIII circulates in plasma complexed with von Willebrand factor (VWF), which protects FVIII from degradation(3). When FVIII is required for clotting, it is dissociated from the VWF by the action of thrombin. FVIII participates of sequential enzymatic reactions that culminate in the formation of fibrin(4).

The most common genetic defect in patients with severe HA is the intron 22 inversion (INV22), which is associated with up to 45% of severe cases of HA(5, 6). Another recurrent mutation is the intron 1 inversion (INV1), which is present in up to 5% of severe HA. Both inversions are caused by recombination events between sequences present in introns 1 and 22 of *F8* and their respective homologous copies present in the telomeric region of X chromosome (7, 8). The remaining cases of HA are due to numerous and distinct mutations distributed throughout the gene. The most common defects are point mutations followed by small insertions and deletions(9).

One of the most serious complications of HA is the development of inhibitors (10, 11). Inhibitors are autoantibodies that develop in response to FVIII replacement therapy in up to 30% of patients with HA. Once inhibitors develop, there is a lack of response to replacement therapy with FVIII concentrates. More than 95% of inhibitors develop within the first 50 exposure days to FVIII-containing products. Immunotolerance induction (ITI) is the treatment of choice for patients who develop persistent inhibitors. It consists of infusion of FVIII concentrates daily or 3 times per week for several months and can eradicate 60-90% of inhibitors. ITI is not yet available as a public policy in Brazil for patients with HA who develop inhibitors.

Inhibitor development is associated with genetic and environmental factors. Within the genetic factors, *F8* genotype has been reported as the most important(12). Mutations associated with a high prevalence of inhibitors include null mutations, large deletions, nonsense mutations, and INV22(13). The reported environmental factors related to inhibitor development are intensive exposure to FVIII concentrates,

presence of concurrent infection/inflammatory state, type of FVIII concentrate used and age at first exposure to FVIII concentrates(14).

We have recently reported the long-term course of inhibitors in HA without ITI and have found that ITI might not be needed for all patients with inhibitors, especially when their maximum historic inhibitor titer is below 10 BU/ml(15). In order to evaluate whether the type of *F8* mutation influences the development of inhibitors, as well as their long-term course, we genotyped 90 patients with severe HA and analysed the association of *F8* genotype and inhibitor formation/ long-term course of inhibitor. We have also evaluated the infectious status for hepatitis B, C, HTLV and HIV in those patients.

Methods

Subjects

The patients enrolled in this study are attended at two Brazilian hemophilia centers - Fundação HEMOMINAS, Minas Gerais, Brazil and Hemocentro de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil (which is an International Hemophilia Training Center of the World Federation of Hemophilia). A total of 90 patients with severe HA with FVIII coagulant activity (FVIII:C) below 0.01 UI/mL (< 1%) were genotyped. All participants were included in the study after signing informed consent. The study was approved by local Ethical Committees.

Inhibitors testing and definition

Information about inhibitors was collected from patients' records. According to local guidelines, it is recommended that patients with haemophilia have inhibitor testing at least once a year (mostly at each 6 months), while on use of replacement treatment or more frequently in selected situations. Tests included inhibitor screening (50:50 mixing test) and quantitation of inhibitor by using either the Bethesda or Bethesda modified assay (16). The 50:50 mixing test was performed with 2 hours pre-incubated samples at 37°C. The Bethesda assay was considered positive if results were above 1 BU/mL. Both laboratories participate on the International External Quality Assessment Scheme by the World Federation of Hemophilia. Inhibitors were classified as "negative" if measurements were < 1 BU/mL and positive if measurements were \geq 1 BU/mL. Persistent inhibitors were classified as two or more inhibitor measurements \geq 1 BU/mL, with interval of 4 weeks between measurements.

Serological testing

Information about serological testing was collected from patients' records. It was considered the last result recorded. Data collected included: anti-HIV I/II (ELISA), anti-HCV (ELISA), anti-HTLV I/II (ELISA), HbSAg and anti-HbS.

Blood samples and DNA preparation

A blood sample (5-10 mL) was collected in ethylenediaminetetraacetic acid or sodium citrate and DNA was extracted from peripheral blood according to standard procedures (17).

Mutations analysis

INV1 was detected by using a multiplex PCR based according to Bagnal and colleagues (7). INV22 was detected by using an inverse PCR based on the method of Rossetti and colleagues (18). PCR amplification of all 26 exons including flanking intronic and promoter regions was performed using primers previously designed by Steve Keeney (19). The amplicons were purified and sequenced in both directions using the ABIPRISM dye terminator cycle sequencing reactions kit (Applied Biosystem, California USA) and electrophoresis was performed on an ABI3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, California USA). All sequences were analyzed by alignment with the wild type *F8* gene sequence Genebank Database (Refseq NG_011403).

Mutation Nomenclature

F8 numbering is based on the cDNA sequence (Ref Seq NM_000132.3) in accordance to the recommendations for description of sequence changes given by Human Genomic Variation Society, HGVS (<http://www.HGVS.org/mutnomen/>). HGVS suggests that the numbering of amino acids should start from methionine of the native protein. The mutations found were compared with mutations described in HGMD database (www.hgmd.cf.ac.uk/)⁴² and *F8* HAMSTeRs database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>).

Data and statistics analysis

The program SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) was used for the statistical analysis. Patients were classified according to the variables: category of mutation (INV1, INV22, nonsense, missense, splice-site and frameshift) presence or absence of persistent inhibitors, serology for HTLV I/II, hepatitis B and C, and HIV I/II. Univariate and bivariate analysis were used for descriptive statistics and for the analysis of association between inhibitor and category of mutation, respectively. To test statistical significance of the associations between variables the Pearson Chi-

Square and the Fisher's Exact Test (for small values) were used. The p-value <0.05 was used as a cut-off for significance.

Results

Mutations analysis

Patients were initially tested for the presence of INV1, which was detected in 8/190 patients (4.2 %) (Figure 1). This mutation was studied in a total of 150 patients from HEMOMINAS and 40 patients from UNICAMP. We also analyzed the presence of INV22 and found 56/90 patients (62.2%) affected. This mutation was studied in 50 patients from HEMOMINAS and 40 from UNICAMP (Figure 1 and 2).

A total of 26/90 patients (28.8%), who were negative for both inversions, were analyzed for the presence of other mutations in the coding and intron-exon boundary regions of *F8*. We found 18 different causative mutations: 6 frameshift mutations (c.3134_3135insC, c.6876_6877insT, c.2295_2296del, c.2962_2963insGT, c.1233_1234insT, c.4866_4868 del), 10 nonsense mutations (c.3981G>T, c.88G>T, c.2440C>T, c.2344G>T, c.5878C>T, c.5032C>T, c.3119T>G, c.2372G>A, c.6496C>T, c.1063C>T) and 2 missense mutations (c.6046C>T, c.901C>T) (Table 1). The missense mutation c.6046C>T was present in two patients, the nonsense mutation c.5878C>T was present in 4 patients, the nonsense mutation c.3982C>T was present in 2 patients and the frameshift mutation c.3134_3135insC was present in 2 patients. A total of 10/19 (52.6%) mutations are here reported for the first time (c.3134_3135insC, c.6876_6877insT, c.3982C>T, c.3780C>G, c.2295_2296del, c.2962_2963insGT, c.1233_1234insT, c.2344G>T, c.3119T>G, c.5032C>T).

A total of 4/90 patients (4.4%) carried a non-synonymous polymorphism (c.3780C>G), a normal sequence variation generally associated with lower FVIII activity (20, 21). In addition, 2 synonymous polymorphisms (c.3981G>T, c.3864A>C) were found in 2 patients. One of them (c.3981G>T) is a new polymorphism (Table 1).

Association between genotypes and inhibitors in patients groups

Data on inhibitor development were available in 75/90 (83%) of genotyped patients. Persistent inhibitors against FVIII developed in 23/75 patients (30.6%). There was no association between the different groups of mutation (INV 1 and 22, nonsense, missense, and frameshift) and the development of persistent inhibitors ($p > 0.05$). The analysis regarding the association between the type of *F8* mutation and the long-term course of inhibitors is underway.

Association between serological testing and inhibitors

The association of the serology for HTLV I/II, hepatitis B and C, and HIV I/II and the presence or absence of persistent inhibitors was also studied. The information was available for all patients. There was no association between any of the different serological tests and the development of persistent inhibitors ($p > 0.05$).

Discussion

We have recently reported the long-term course of inhibitors in HA without ITI and have found that ITI might not be needed for all patients with inhibitors, especially when their maximum historic inhibitor titer is below 10 BU/ml (15). In order to evaluate whether the type of *F8* mutation influences the development of inhibitors and of their long-term course, we genotyped 90 patients with severe HA from two Brazilian hemophilia centers and analysed the relationship between genotype and inhibitor formation. We have also evaluated the infectious status for hepatitis B, C, HTLV and HIV in those patients.

The INV1 was searched in 190 patients and was present in 8 patients (4.2 %). This frequency is similar to others reported in the literature, although there are variations in the populations studied (22). The INV22 was found in 56/90 patients (62.2%). This prevalence is higher than the ones reported in the literature, which are in the range of 40-50%(23). This is likely to reflect the fact that, in Hemocentro de Campinas, there was a preferential genotyping of patients with HA and inhibitor. Indeed, in 27/40 patients (67.5%) from this center presented INV22, in contrast with 29/50 (53%) of patients from Fundação HEMOMINAS.

Direct sequencing of coding and intron-exon boundary regions of *F8* demonstrated 19 different causative mutations: 6 frameshift mutations (c.3134_3135insC, c.6876_6877insT, c.2295_2296del, c.2962_2963insGT, c.1233_1234insT, c.4866_4868 del), 10 nonsense mutations (c.3981G>T, c.88G>T, c.2440C>T, c.2344G>T, c.5878C>T, c.5032C>T, c.3119T>G, c.2372G>A, c.6496C>T, c.1063C>T) and 2 missense mutations (c.6046C>T, c.901C>T). Ten mutations (c.3134_3135insC, c.6876_6877insT, c.3982C>T, c.3780C>G, c.2295_2296del, c.2962_2963insGT, c.1233_1234insT, c.2344G>T, c.3119T>G, c.5032C>T) are new mutations and are here reported for the first time.

Data on inhibitor development were available in 75/90 (83%) of genotyped patients and persistent inhibitors against FVIII developed in 23/75 patients (30.6%). This prevalence is at the highest level described in patients with HA, which ranges from 10-30%. The main reason for this is probably due to the preferential genotyping of patients with HA and inhibitor in Hemocentro de Campinas. Indeed, 16/24 (60%) of these genotyped patients presented inhibitors against FVIII. On the contrary, only 5/50 (10%) of genotyped patients from Fundação HEMOMINAS developed persistent inhibitors. There was no association between the different groups of mutation (INV 1

and 22, nonsense, missense, splice-site and frameshift) and the development of persistent inhibitors ($p > 0.05$). The analysis regarding the association between the type of *F8* mutation and the long-term course of inhibitors is still underway.

Some reports have shown an association between acute or chronic infection with the development of persistent inhibitors(24). Therefore, we collected data on serology for HIV I/II, HTLV I/II, hepatitis B and C and analysed their association with the presence or absence of persistent inhibitors. Data analysis showed no association between any of the different serological tests and the development of persistent inhibitors ($p > 0.05$).

Understanding the genetic and environmental risk factors responsible for increased risks of inhibitors development is essential to identify a patient's risk profile. The development of persistent inhibitors in congenital hemophilia A is due to complex mechanisms that involve genetic and non-genetic risk factors. According to our data, the development of persistent inhibitors was not associated with any of the categories of mutations in 90 genotyped patients with severe HA. This study is a first analysis. Others research, also involving specific factors, such as the patient's immune system, and data on intensity of treatment could provide more conclusive information about inhibitors development.

Table 1: Summarized data of *F8* sequence variations in patients with severe hemophilia A

IDENTIFICATION	TYPE MUTATION	EFFECT OF MUTATION	MUTATION	INHIBITOR	SEROLOGICAL TESTING					
					HIV I/II	HTLV/II	HBSAg	Anti-HBS	Anti-HBC	Anti-HCV
01	Inversion	Rearrangement	inv22	X	NR	NR	NR	NR	NR	R
02	Inversion	Rearrangement	inv22	X	NR	NR	NR	NR	NR	NR
03	Inversion	Rearrangement	inv22	X	R	NR	NR	NR	NR	NR
04	Inversion	Rearrangement	inv22	X	NR	NR	NR	NR	R	R
05	Inversion	Rearrangement	inv1	N	R	NR	R	NR	R	R
06	Inversion	Rearrangement	inv1	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
07	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	NR	NR	R
08	Inversion	Rearrangement	inv1	P	NR	R	NR	NR	R	R
09	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
10	Inversion	Rearrangement	inv22	P	NR	NR	NR	NR	NR	R
11	Inversion	Rearrangement	inv22	X	NR	NR	NR	NR	NR	NR
12	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	NR	NR	R
13	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	NR	NR	R
14	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	NR	R	R
15	Inversion	Rearrangement	inv22	X	NR	NR	NR	NR	NR	NR
16	Insertion*	Frameshift	c.3134_3135insC (B) EX14	P	NR	NR	NR	NR	NR	R
16	Substitution	Polymorphism	c.3780C>G (B) EX14							
17	Inversion	Rearrangement	inv1	N	NR	NR	NR	NR	NR	R
18	Inversion	Rearrangement	inv1	N	NR	NR	NR	NR	R	R
19	Inversion	Rearrangement	inv1	N	NR	NR	NR	NR	NR	R
20	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	NR	R	R
21	Insertion*	Frameshift	c.6876_6877insT (C2) EX25	X	NR	NR	NR	NR	NR	NR
22	Substitution*	Nonsense	c.3982C>T (B) EX14	N	NR	NR	NR	NR	R	NR
22	Substitution*	polymorphism	c.3981G>T (B) EX14							
23	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	NR	R	R
24	Inversion	Rearrangement	inv22	X	NR	NR	NR	NR	NR	NR
25	Substitution	Missense	c.901C>T (A1) EX 7	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
25	Substitution	polymorphism	c.3864A>C (B) EX14							
26	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
27	Substitution*	Nonsense	c.88G>T (A1) EX1	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
27	Substitution	polymorphism	c.3780C>G (B) EX14							
28	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
29	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	NR	R	R
30	Deletion*	Frameshift	c.2295_2296del (B) EX14	N	NR	NR	NR	NR	NR	R
31	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
32	Inversion	Rearrangement	inv22	X	NR	NR	NR	NR	NR	NR
33	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	NR	NR	R
34	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	NR	NR	R
35	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
36	Substitution	Nonsense	c.2440C>T (B) EX14	N	NR	NR	NR	NR	R	R
37	Insertion*	Frameshift	c.2962_2963insGT (B) EX14	N	NR	NR	NR	NR	R	NR
38	Inversion	Rearrangement	inv1	P	NR	NR	R	NR	R	R
39	Inversion	Rearrangement	inv22	X	NR	NR	NR	NR	NR	NR
40	Insertion*	Frameshift	c.1233_1234insT (A2) EX8	N	NR	NR	NR	NR	NR	R
40	Substitution	Polymorphism	c.3780C>G (B) EX14							
41	Substitution*	Nonsense	c.3982C>T (B) EX14	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
41	Substitution	polymorphism	c.3981G>T (B) EX14							
42	Inversion	Rearrangement	inv1	P	NR	NR	NR	NR	R	R
43	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	NR	R	R
44	Insertion*	Frameshift	c.3134_3135insC (B) EX14	P	NR	NR	NR	NR	NR	NR
44	Substitution	Polymorphism	c.3780C>G (B) EX14							
45	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	R	NR	NR	NR	R
46	Inversion	Rearrangement	inv22	X	NR	NR	NR	NR	NR	NR

47	Inversion	Rearrangement	inv22	X	NR	NR	NR	NR	NR	NR
48	Inversion	Rearrangement	inv22	X	NR	NR	NR	NR	NR	NR
49	Substitution	Nonsense	c.2440C>T (B) EX14	X	NR	NR	NR	NR	NR	NR
50	Substitution*	Nonsense	c.2344G>T (B) EX14	X	NR	NR	NR	NR	NR	NR
51	Inversion	Rearrangement	inv22	P	NR	NR	NR	R	NR	NR
52	Substitution	Nonsense	c.5878C>T (A3) EX18	P	NR	NR	NR	R	NR	R
53	Substitution	Nonsense	c.5878C>T (A3) EX18	P	NR	NR	NR	R	NR	R
54	Substitution	Nonsense	c.5878C>T (A3) EX18	P	NR	NR	NR	R	NR	R
55	Inversion	Rearrangement	inv22	P	NR	NR	NR	R	NR	NR
56	Inversion	Rearrangement	inv22	P	NR	NR	NR	R	NR	NR
57	Inversion	Rearrangement	inv22	P	NR	NR	NR	R	R	R
58	Inversion	Rearrangement	inv22	P	NR	NR	NR	R	NR	NR
59	Substitution	Nonsense	c.5878C>T (A3) EX18	P	NR	NR	NR	R	NR	R
60	Inversion	Rearrangement	inv22	P	NR	NR	NR	R	NR	NR
61	Inversion	Rearrangement	inv22	P	NR	NR	NR	NR	NR	NR
62	Inversion	Rearrangement	inv22	P	NR	NR	NR	R	NR	NR
63	Inversion	Rearrangement	inv22	P	NR	NR	NR	R	NR	NR
64	Inversion	Rearrangement	inv22	P	R	R	R	R	R	R
65	Deletion	Frameshift	c.4866_4868 del (B) EX 14	P	NR	NR	NR	R	NR	R
66	Substitution*	Nonsense	c.5032C>T (A3) EX 14	P	NR	NR	NR	R	R	R
67	Inversion	Rearrangement	INV22	N	NR	NR	NR	R	NR	R
68	Substitution	Missense	c.6046C>T (A3) EX19	P	NR	NR	NR	R	NR	NR
69	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	R	NR	NR
70	Inversion	Rearrangement	inv22	N	R	R	R	R	R	R
71	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	R	NR	NR
72	Substitution*	Nonsense	c.3119T>G (B) EX 14	N	NR	NR	NR	R	NR	NR
73	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	NR	NR	R
74	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	R	NR	NR
75	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	R	NR	NR
76	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	R	NR	NR
77	Substitution	Nonsense	c.2372G>A (B) EX14	N	NR	NR	NR	R	NR	NR
78	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	R	NR	NR
79	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	R	NR	NR
80	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	R	NR	R
81	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	R	NR	R
82	Substitution	Nonsense	c.6496C>T (C1)EX23	N	NR	NR	NR	NR	R	R
83	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	R	NR	NR
84	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	R	NR	NR
85	Substitution	Nonsense	c.1063C>T (A1) EX8	N	NR	NR	NR	R	NR	NR
86	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	R	NR	NR
87	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	R	NR	NR
88	Substitution	Missense	c.6046C>T (A3) EX19	P	NR	NR	NR	NR	NR	NR
89	Substitution	Nonsense	c.2372G>A (B) EX14	N	NR	NR	NR	R	NR	NR
90	Inversion	Rearrangement	inv22	N	NR	NR	NR	R	NR	R

The numbering of *F8* mutations is based on cDNA sequence (RefSeq NM_000132.3) according to international recommendations for the descriptions of sequence changes given by the Human Genome Variations Society, HGVS (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>). (*) novel mutations and polymorphisms, not previously reported in HAMSTeRS database (<http://europium.csc.mrc.ac.uk/>) or HGMD database (www.hgmd.cf.ac.uk/). Abbreviations: P, persistent positive inhibitor; N, negative; NR, non reagent; R, reagent; c., coding DNA sequence, inv, inversion; del, deletion; ins, insertion; Domains and exons are indicated where appropriate.

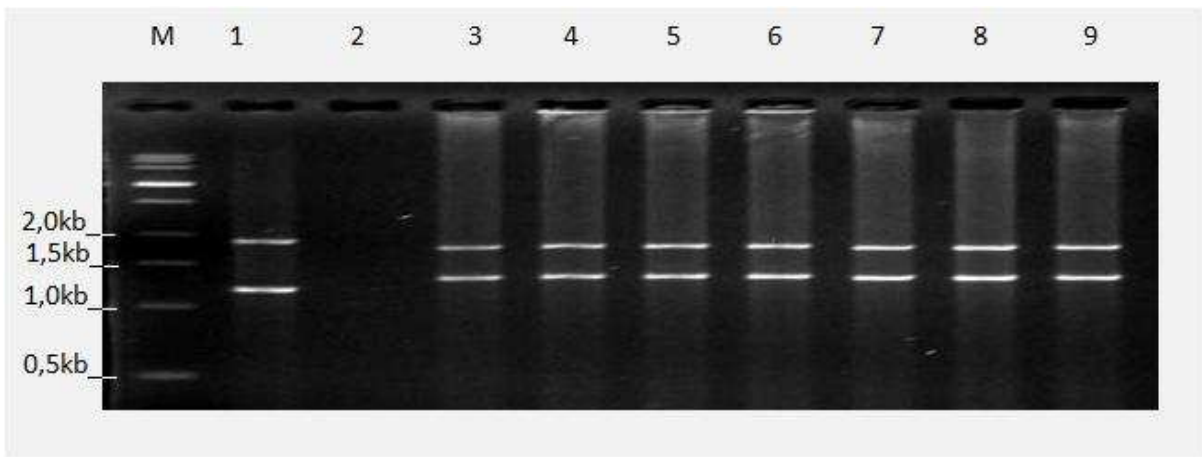


Figure 1: Electrophoresis gel of *F8* intron 1 inversion. M, molecular weight marker (Perfect DNA™ Markers, 0,5-12kbp, Novagen, Gibbstown, USA); lane 1, control patients without intron 1 inversion with fragments of 1908 bp and 1191 bp; lane 2, blank; lanes 3-9, patients with intron 1 inversion with fragments of 1726 bp and 1323 bp.

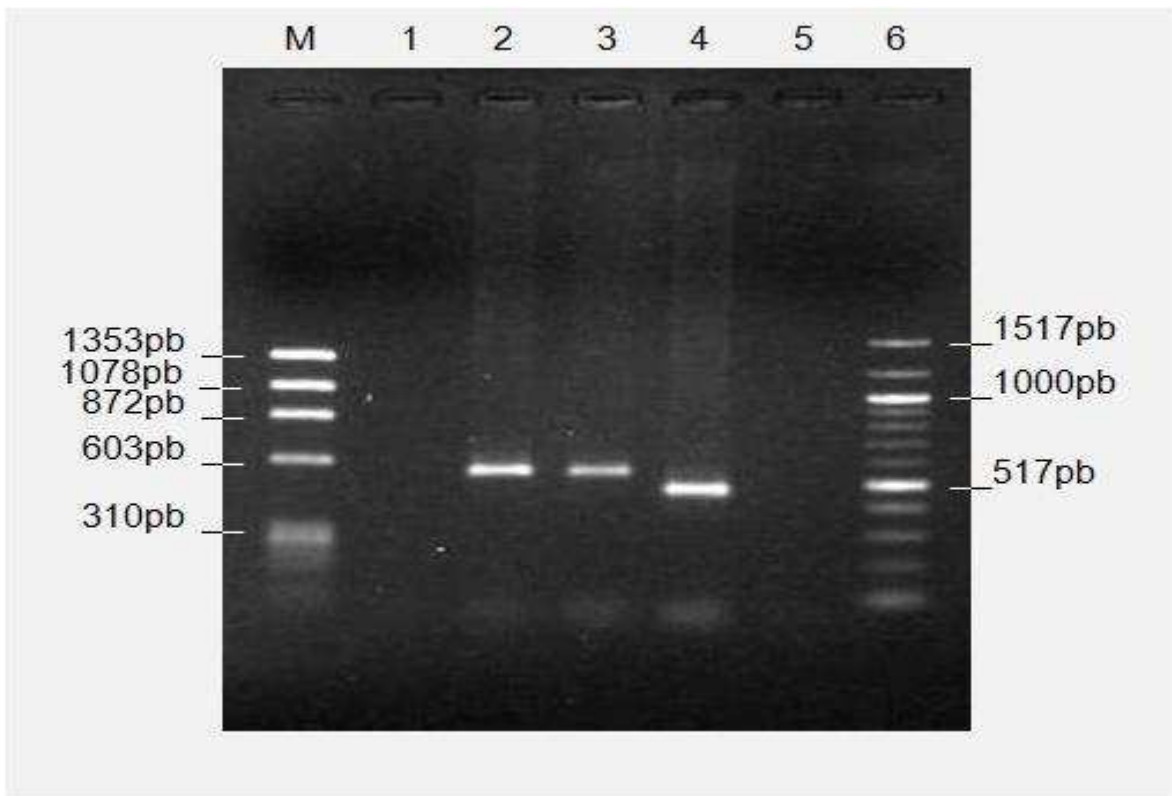


Figure 2: Gel electrophoresis of *F8* intron 22 inversion. M and lane 6, molecular weight markers (LX174 DNA/BsuRI(HaeIII) Fermentas, Vilnius-Lithuania)- ; lanes 1 blank; lanes 2 and 3, patients with intron 22 inversion; lane 4, patient without FVIII intron 22 inversion.

References

1. Green P, Bagnall R, Waseem N, Giannelli F. Haemophilia A mutations in the UK: results of screening one-third of the population. *Br J Haematol.* 2008 Oct;143(1):115-28.
2. Fang H, Wang L, Wang H. The protein structure and effect of factor VIII. *Thromb Res.* 2007;119(1):1-13.
3. Terraube V, O'Donnell J, Jenkins P. Factor VIII and von Willebrand factor interaction: biological, clinical and therapeutic importance. *Haemophilia.* 2010 Jan;16(1):3-13.
4. Hoffman M, Monroe Dr. A cell-based model of hemostasis. *Thromb. Haemost.* 2001 Jun;85(6):958-65.
5. Lakich D, Kazazian HJ, Antonarakis S, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet.* 1993 Nov;5(3):236-41.
6. Naylor J, Brinke A, Hassock S, Green P, Giannelli F. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. *Hum Mol Genet.* 1993 Nov;2(11):1773-8.
7. Bagnall R, Waseem N, Green P, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood.* 2002 Jan;99(1):168-74.
8. Bagnall R, Giannelli F, Green P. Int22h-related inversions causing hemophilia A: a novel insight into their origin and a new more discriminant PCR test for their detection. *J Thromb. Haemost.* 2006 Mar;4(3):591-8.
9. Aquila M, Pasino M, Santoro C, Lanza T, Molinari A, Bottini F, et al. Germ-line origin of intron 1 inversion in two haemophilia A families. *Haemophilia.* 2003 Nov;9(6):717-20.
10. Bogdanova N, Markoff A, Pollmann H, Nowak-Göttl U, Eisert R, Wermes C, et al. Spectrum of molecular defects and mutation detection rate in patients with severe hemophilia A. *Hum Mutat.* 2005 Sep;26(3):249-54.
11. Riccardi F, Tagliaferri A, Martorana D, Rivolta G, Valdrè L, Rodorigo G, et al. Spectrum of F8 gene mutations in haemophilia A patients from a region of Italy: identification of 23 new mutations. *Haemophilia.* 2010 Sep;16(5):791-800.
12. Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia.* 2006 Dec;12 Suppl 6:15-22.
13. Boekhorst J, Lari GR, D'Oiron R, Costa JM, Nováková IR, Ala FA, et al. Factor VIII genotype and inhibitor development in patients with haemophilia A: highest risk in patients with splice site mutations. *Haemophilia.* 2008 Jul;14(4):729-35.

14. Santagostino E, Mancuso ME, Rocino A, Mancuso G, Mazzucconi MG, Tagliaferri A, et al. Environmental risk factors for inhibitor development in children with haemophilia A: a case-control study. *Br J Haematol*. 2005 Aug;130(3):422-7.
15. Caram C, de Souza RG, de Sousa JC, Araújo Pereira T, do Amaral Cerqueira AM, van der Bom JG, et al. The long-term course of factor VIII inhibitors in patients with congenital haemophilia A without immune tolerance induction. *Thromb. Haemost*. 2010 Nov;105(1).
16. Kasper CK, Aledort L, Aronson D, Counts R, Edson JR, van Eys J, et al. Proceedings: A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh*. 1975 Nov 15;34(2):612.
17. Bowen D, Keeney S. Unleashing the long-distance PCR for detection of the intron 22 inversion of the factor VIII gene in severe haemophilia A. *Thromb. Haemost*. 2003 Jan;89(1):201-2.
18. Rossetti L, Radic C, Larripa I, De Brasi C. Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR. *Clin Chem*. 2005 Jul;51(7):1154-8.
19. Keeney S. Amplification of the essential regions of the *F8* gene utilising a standard primer set.
20. Viel K, Ameri A, Abshire T, Iyer R, Watts R, Lutcher C, et al. Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia. *N Engl J Med*. 2009 Apr;360(16):1618-27.
21. Scanavini D, Legnani C, Lunghi B, Mingozzi F, Palareti G, Bernardi F. The factor VIII D1241E polymorphism is associated with decreased factor VIII activity and not with activated protein C resistance levels. *Thromb. Haemost*. 2005 Mar;93(3):453-6.
22. Leiria L, Roisenberg I, Salzano F, Bandinelli E. Introns 1 and 22 inversions and factor VIII inhibitors in patients with severe haemophilia A in southern Brazil. *Haemophilia*. 2009 Jan;15(1):309-13.
23. Boekhorst J, Verbruggen B, Lavergne J, Costa J, Schoormans S, Brons P, et al. Thirteen novel mutations in the factor VIII gene in the Nijmegen haemophilia A patient population. *Br J Haematol*. 2005 Oct;131(1):109-17.
24. Chambost H. Assessing risk factors: prevention of inhibitors in haemophilia. *Haemophilia*. 2010 Mar;16 Suppl 2:10-5.

4.5 Resultados adicionais : Muehle C, Pio SF, Soares S, Oliveira GC , Rezende SM. Molecular characterization of an aberrant intron 1 inversion pattern in the factor VIII gene in a patient with severe hemophilia A. (Em redação)

Molecular characterization of an aberrant intron 1 inversion pattern in the factor VIII gene in a patient with severe hemophilia A

(In preparation)

C. Muehle¹, S. F. Pio², S Soares³, G. C Oliveira⁴, S. M. Rezende⁵

1-Department of Pediatrics, Medical University of Innsbruck, Austria and Department of Psychiatry and Psychotherapy, University of Erlangen-Nuernberg, Germany

2-Hematology Laboratory, FHEMIG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

3-Hemocentro de Uberaba, Fundação HEMOMINAS, Uberaba, Minas Gerais

4-Laboratory of Cellular and Molecular Parasitology, René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

5-Internal Medicine, Faculty of Medicine, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Short title: An aberrant pattern of factor VIII intron 1 inversion

Key words: hemophilia A, factor VIII intron 1 inversion, gene, mutation

Scientific category: Original article

Correspondence

Christiane Muehle

Molecular Neurobiology, Dept.of Psychiatry and Psychotherapy,
University Hospital Erlangen, Schabachanlage 6, 91054 Erlangen,
Germany. Tel.: ++49 9131 85 44738; Fax: ++49 9131 85 29318;

E-Mail: Christiane.Muehle@molbio-research.eu

Abstract

Background: Congenital hemophilia A is caused by a broad spectrum of mutations in the gene encoding the coagulation factor VIII (*F8*). Two recurrent inversions are responsible for the coagulation disorder in about half of the severely affected patients. Whereas several abnormal patterns found in routine mutation screening for the more frequent *int22h*-related inversions have been classified into subtypes, data on aberrant patterns for the diagnosis of the *int1h*-related inversion are scarce. Furthermore, the molecular mechanism behind those aberrant patterns has not been explored to date. Recently, we described an unusual pattern for *F8* intron 1 inversion in a Brazilian patient with severe haemophilia A. This unusual pattern was further investigated in order to elucidate the molecular events behind this causative mutation.

Methods: Genomic DNA was isolated from the proband's blood and his relatives. This was used for analysis of exonic and intronic *F8* regions using conventional polymerase chain reaction (PCR) followed by subsequent tests of inverse-PCR and sequencing. In parallel, quantitative PCR and primer walking tests are underway to elucidate the molecular event.

Results: Our results point to a third *int1h*-copy mediating the recombination event. According to amplification using internal primers for *int1h-1* sequence, this third copy is a defective copy of *int1h*, which mediates the recombination event.

Conclusion: The presentation of this case report demonstrates that, as observed for the intron 22 inversion, unusual pattern of mutations are also observed for the intron 1 inversion. Additional testing in progress will show detail of this recombination event.

Introduction

Hemophilia A, the most common severe coagulation disorder in males, is caused by absence or impaired activity of clotting factor VIII (FVIII) resulting from a broad spectrum of mutations in the 186 kb large X-chromosomal FVIII gene (*F8*). Its location at the most distal band (Xq28) of the long arm of the X chromosome facilitates rearrangements especially during male meiosis due to the higher flexibility of the telomeric end of the X chromosome in the absence of a second pairing X-chromosome(1). Consequently, two recurrent inversions are responsible for the coagulation disorder in about half of the severely affected patients(2) (3). In the more frequent case, a hot spot of intrachromosomal recombination between a 9.5 kb region within *F8* intron 22 and one of its two extragenic telomeric copies leads to the recombination event (4). More rarely, disruption of *F8* may also occur by recombination between a 1 kb portion of *F8* intron 1 (*int1h1*) and its duplicated 140 kbp distant extragenic version, *int1h2* (5).

We have recently found that *int22h*-related inversions can be associated with concomitant large deletions in *F8* (6), which is responsible for an increased risk of an immune response against therapeutic exogenous FVIII. However, whereas abnormal patterns in routine mutation screening for *int22h*-related inversions have been classified into subtypes and sometimes even involve additional copies of the *int22h* region, data on aberrant results for the *int1h*-diagnosis are scarce and the rearrangements have not yet been explained at the genomic level. This study aimed at the elucidation of the molecular defect underlying such an unusual pattern that was discovered in a Brazilian haemophiliac.

Materials and Methods

Subjects and DNA extraction

The index patient (a man of forty years old with family history of haemophilia) and his relatives (Figure 1), were studied after informed consent to participate in the study in accordance with the Declaration of Helsinki. Genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes by standard procedure (7).

Analysis of *F8* intron 1 inversion

The patients and his relatives were analysed for the *F8* intron 1 inversion by multiplex PCR as described by Bagnall and colleagues (5). Primers and pattern of amplification for analysis of FVIII intron 1 inversion are showed in Table 1.

Analysing the integrity of int1h-1

In order to analyse the integrity of int1h-1, PCR reactions were performed by using primers designed for the internal region of int1h (Table 2). The amplification of internal int1h-1 was performed by using 50-100 ng of genomic DNA, in a final reaction volume of 25 μ l containing 1,5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl (pH8,7), 50 mM KCl and 1 U of Taq polymerase (Fermentas, Vilnius Lithuania). After an initial denaturation at 95° C for 5 min, thirty cycles of PCR were carried out at 94°C for 30 seconds, 65°C for 30 seconds and 72°C for 2 minutes.

Inverse PCR for location of the third copy of int1h

An attempt to elucidate the site of the third copy of int1h, we developed a strategy based on inverse PCR. The int1h-1 was scanned with program WEB cutter (<http://bio.lundberg.gu.se/cutter2/>) (8) for analysis of restriction enzymes that do not cut the internal region int1h-1, but eventually have restriction sites in flanking sequences of int1h-1. Among the various enzymes found, we selected the enzyme *Hinf*I to initiate the analysis. The genomic DNA of index patient was digested with the restriction enzyme *Hinf*I. The resulting fragments were used for a ligation reaction and the circular fragments were used as template for PCR reaction. The oligonucleotides used in this PCR were the same used for amplification of the

internal region of int1h-1. The PCR conditions were the same used for amplification of the internal region of int1h-1.

Primer walking and interlaced and unpredictably primed PCR

Primer walking techniques were performed using the DNA of the index patient including thermal asymmetric interlaced and unpredictably primed PCR to identify unknown sequences flanking the amplifiable region. In addition, analysis by real time PCR also is in course.

Results and Discussion

Analysis of *F8* intron 1 inversion

The analysis of *F8* intron 1 inversion of the index patient and his relatives are shown in Figure 2. Wild type subjects show a fragment of 1908 bp (copy int1h-1) and a fragment of 1191 bp (copy int1h-2), while subjects with *F8* intron 1 inversion display a fragment of 1323 bp (int1h-1) and a fragment of 1776 bp. The index patient shows a fragment of 1323 bp (int1h-1) and a fragment of 1191 bp. Schematic representation of the results is shown in Figure 3.

The presence of a fragment of 1323 bp resulting from the amplification of int1h-1 in the index patient confirms the pattern of inversion. But, on the contrary, the presence of a fragment of 1191 bp resulting of amplification of int1h-2 is compatible with the absence of *F8* intron 1 inversion. The absence of the 1776 bp band typical for inverted fragment on patients with the inversion, pointed to a deletion in the site of annealing of the primer that associated to 9F primers. These results are supported by results of PCR analysis for internal amplification of int1h-1. Attempts to amplify int1h-1 region involving primer 9F failed consistently when combined with primer int1h-2R. These results pointed to the possibility of a third copy of int1h responsible for the recombination event. This hypothesis is shown in Figure 4.

Analysing the integrity of int1h-1

The amplification of the region int1h-1 when using internal primers combined with primer 9F (Table 2) showed a pattern of amplification when we used the combination 9F + 100RA. However, no amplification was observed in other combinations (data not shown).

Inverse PCR for location of the third copy of int1h

The assays based on inverse PCR still did not show any pattern of amplification. Negative result may be explained by the position of restrictions sites for *hinfI* in the flanking regions int1h-1. The restriction sites for *HinfI* could be located at distant points that prevented the amplification of a fragment by conventional PCR. Further tests are underway with other restriction enzymes.

The knowledge of this first analysed case and the interpretation of two previously independently reported patterns suggests that aberrant pattern for intron1 inversion may be a recurrent event in analogy to recurring int22h-inversions(6) Besides its relevance for clinical, the detection of additional patterns could lead to understanding of mechanisms behind genomic rearrangements causing hemophilia and other diseases.

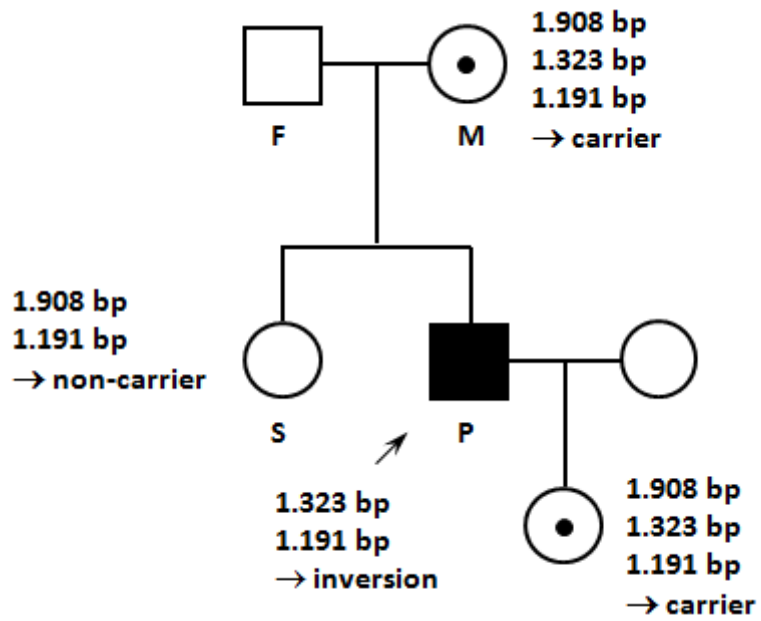


Figure 1. Pedigree of proband's family showing the pattern of amplification of intron 1 inversion. Abbreviations: F, father, M, Mother, S, sister, P, proband, Kb, Kilobase.

Table 1. Primers and patterns of amplification for the analysis of intron 1 inversion. Abbreviation: INV1, FVIII intron 1 inversion; bp, base pairs.

Analysis of intron 1 inversion		
Primer	Sequence (5'-3')	bp
9cR	CTAGCTTGAGCTCCCTGTGGG	20
9F	TTGTTGGGAATGGTTACGG	20
Int1h-2F	GGCAGGGATCTTGTTGGTAAA	21
Int1h-2R	TGGGTGATATAAGCTGCTGAGCTA	24
Description of pattern of amplification		
Reaction	1	2
Sequence	Int1h-1 (intragenic copy)	Int1h-2 (extragenic copy)
Primers	9F, Int1h-2F, 9cR	9F, Int1h-2F, Int1h-2R
Without INV1	(9F/9cR) 1908 bp	(Int1h-2F/Int1h-2R) 1191 bp
With INV1	(Int1h-2F/9cR) 1323 bp	(Int1h-2R/9F) 1726 bp
carriers	(9F/9cR) 1908 bp (Int1h-2F/9cR) 1323 bp	(Int1h-2F/Int1h-2R) 1191 bp (Int1h-2R/9F) 1726 bp

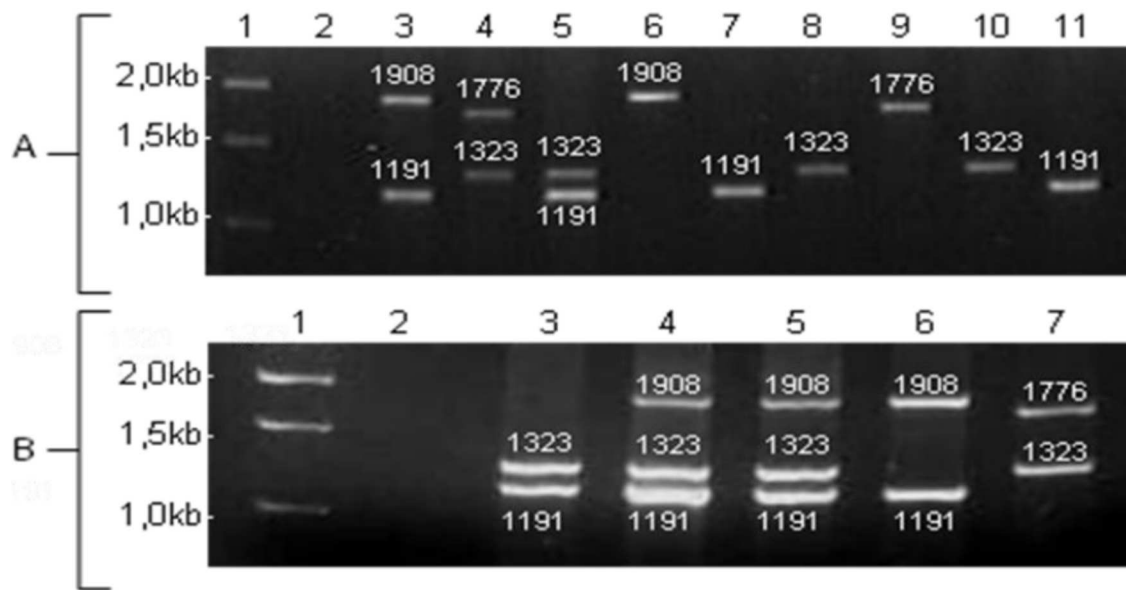


Figure 2. PCR products for detection of intron 1 inversion. (A) Lane 1, Molecular weight marker (Perfect DNA™ Markers, 0,5-12kbp, Novagen, Gibbstown, USA); lane 2, negative control; lane 3, patient without inv1 showing fragments of 1908 bp and 1191 bp from the amplification of int1h-1 and int1h-2, respectively; lane 4, patient with inv1 showing fragments of 1,323 bp and 1776 bp related to reaction of int1h2/1 and int1h1/2, respectively; lane 5, proband with abnormal pattern of inv1 showing fragments of 1323 bp and 1191 bp related to reaction int1h-1 and int1h-2, respectively; lane 6, int1h-1 patient without inv1; lane 7, int1h-2 of patient without inv1; lane 8, int1h-1 of patient with inv1; lane 9 int1h-2 of patient with inv1; lane 10, int1h-2/1 of proband; lane 11, int1h1/2 of proband. (B) Lane 1, Molecular weight marker (Perfect DNA™ Markers, 0,5-12kbp, Novagen, Gibbstown, USA); lane 2, negative control; lane 3, proband with the abnormal inv 1 pattern; lane 4, proband's mother; lane 5, proband's daughter; lane 6, proband's sister; lane 7, patient with Inv1.

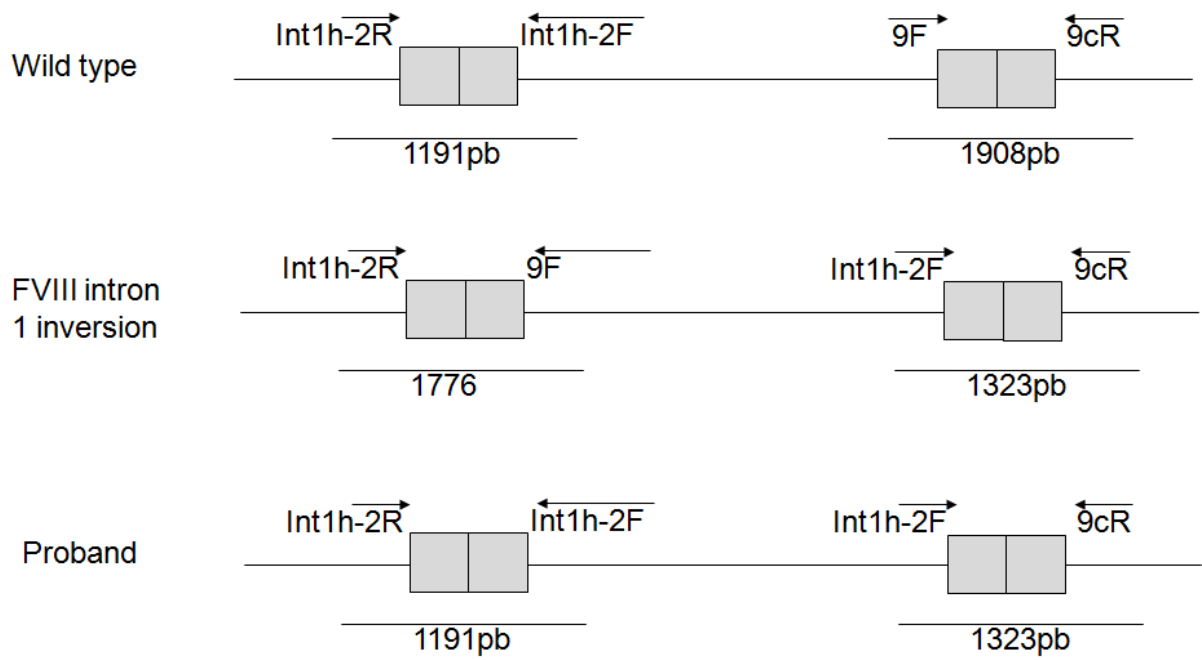
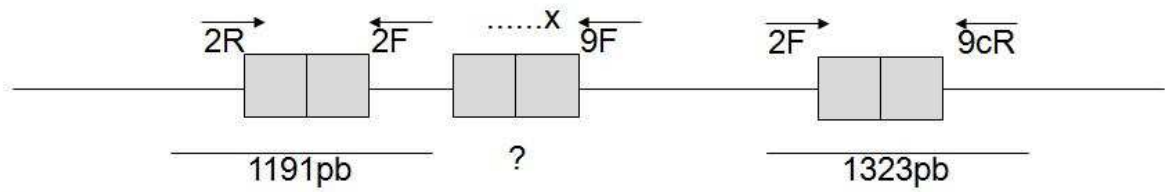


Figure 3. Schematic representation of the pattern of amplification found in wild type, intron 1 inversion and the pattern found in proband

A)



B)



Figure 4. Schematic representation of the hypothesis of the third copy of int1h-1. A, The copy is downstream int1h-2; B, the copy is upstream int1h-2

Table 2. Oligonucleotides for internal int1h-1 and combination of oligos with the primer 9F.

Primer	Sequence (5'-3')	Size (bp)
100RA	CTG TAC TGG CTG AGG GCC AGG GC	23
100RB	GCA TCA GGT TGC AGA CAA AGC AG	23
100FA	CAC TCA CTA ATA TGC CTT TGT C	22
100FB	GTG TCC GTC CCT CTC CTT TCG	21
Combination of primers		
9F	100RA	Fragment of ~700pb
9F	100RB	No amplification
9F	9cR	No amplification

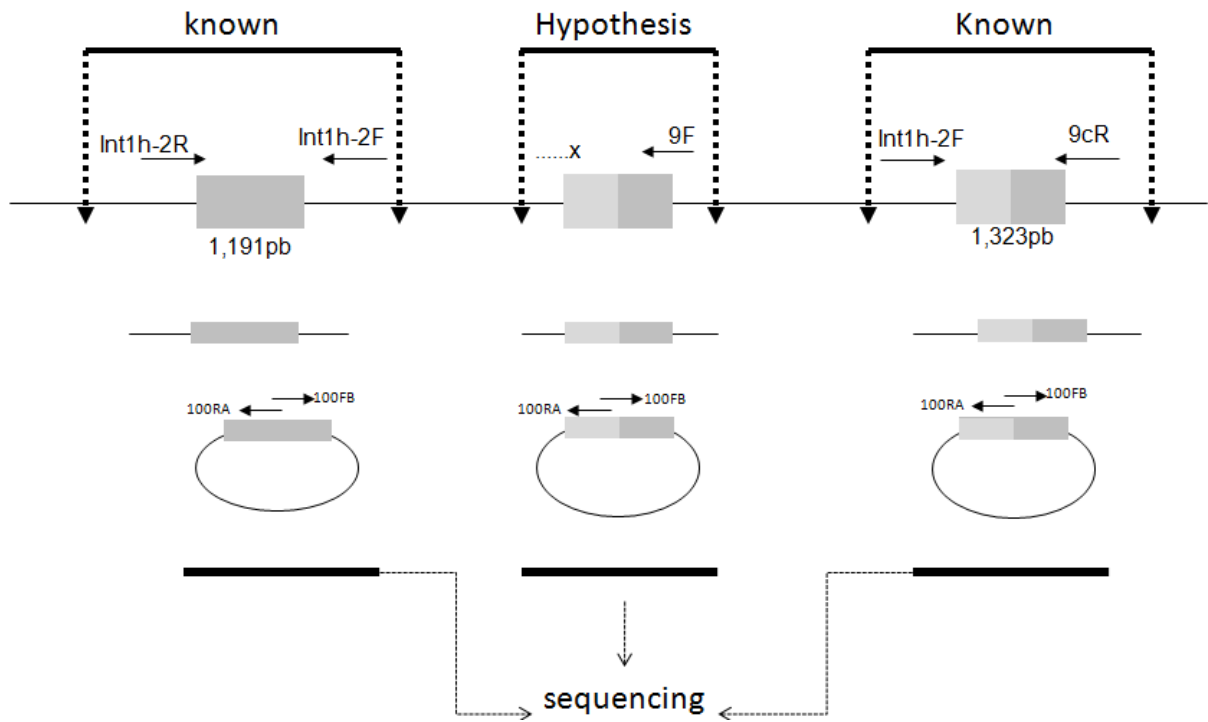


Figure 5. Schematic representation of the strategy to locate the defective copy of *int1h-1*

References

1. Rossiter JP, Young M, Kimberland ML, Hutter P, Ketterling RP, Gitschier J, et al. Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. *Hum Mol Genet.* 1994 Jul;3(7):1035-9.
2. Naylor J, Brinke A, Hassock S, Green P, Giannelli F. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. *Hum Mol Genet.* 1993 Nov;2(11):1773-8.
3. Brinke A, Tagliavacca L, Naylor J, Green P, Giangrande P, Giannelli F. Two chimaeric transcription units result from an inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene and a region reportedly affected by reciprocal translocations in T-cell leukaemia. *Hum Mol Genet.* 1996 Dec;5(12):1945-51.
4. Lakich D, Kazazian HJ, Antonarakis S, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet.* 1993 Nov;5(3):236-41.
5. Bagnall R, Waseem N, Green P, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood.* 2002 Jan;99(1):168-74.
6. Mühle C, Zenker M, Chuzhanova N, Schneider H. Recurrent inversion with concomitant deletion and insertion events in the coagulation factor VIII gene suggests a new mechanism for X-chromosomal rearrangements causing hemophilia A. *Hum Mutat.* 2007 Oct;28(10):1045.
7. Bowen D, Keeney S. Unleashing the long-distance PCR for detection of the intron 22 inversion of the factor VIII gene in severe haemophilia A. *Thromb. Haemost.* 2003 Jan;89(1):201-2.
8. Heiman M. WEB cutter. 1997 [cited 2010 october, 20, 2010].

5 Considerações Finais

O Brasil tem a terceira maior população mundial de pacientes com hemofilia. Estudos focados na caracterização molecular das hemofilias são escassos no Brasil. O objetivo geral deste estudo foi o de caracterizar, em nível molecular, uma coorte de pacientes com hemofilia A grave atendidos na Fundação HEMOMINAS. Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo com este objetivo realizado no Estado de Minas Gerais.

Um dos aspectos relevantes observados neste trabalho foi a heterogeneidade de mutações exibidas por pacientes com hemofilia A grave, sendo algumas destas mutações novas, aqui descritas pela primeira vez. Este achado pode ser explicado pela expressiva miscigenação racial presente em nossa população.

Ainda, foi encontrada uma mutação da inversão do intron 1 com padrão aberrante, tendo sido aqui descrita pela primeira vez. Sua caracterização, em nível molecular, encontra-se em andamento, mas esboça a existência de um padrão complexo de alteração genética. De forma semelhante, observou-se uma grande heterogeneidade de mutações em associação com a presença de inibidores persistentes. Não houve, entretanto, associação de mutações específicas com esta complicação.

Este achado contradiz alguns trabalhos que relataram maior prevalência de mutações específicas com o desenvolvimento de inibidores. Ainda, não houve associação de inibidores com fatores que desafiam o sistema imunológico, tal como a presença de infecções virais transmitidas por hemocomponentes e hemoderivados. Estes achados demonstram que a formação de inibidores em pacientes com hemofilia A é um evento multifatorial e para ao qual colaboram outros fatores além do genótipo de *F8*. Este estudo é uma primeira abordagem deste complexo problema, cujos esclarecimentos estarão condicionados á novas análises envolvendo principalmente aspectos do sistema imune do paciente e intensidade do regime de tratamento.

6 ANEXOS

6.1 Recomendação do sub comitê científico em fator VIII e IX do Comitê científico e padronização da “International Society on Thrombosis and Haemostasis”.

Posted on ISTH Website 29 November, 2000

Scientific and Standardization Committee Communication Definitions in Hemophilia

On behalf of the Subcommittee on Factor VIII and Factor IX of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis

Gilbert C. White, II^{*}, Frits Rosendaal, Louis M. Aledort, Jeanne M. Lusher, Chantal Rothschild, Jørgen Ingerslev, on behalf of the Factor VIII and Factor IX Subcommittee.

Classification of the severity of hemophilia

Classification of the severity of hemophilia has been based on either clinical bleeding symptoms or plasma procoagulant levels. The most widely used classification is based on plasma procoagulant levels, with persons with <1% factor defined as severe; 1-5% or 1-7% as moderately severe; and >5% or >7%, as mild. At the same time, classification based on clinical symptoms has been used because occasional patients with a factor VIII or factor IX level <1% exhibit little or no spontaneous bleeding and appear to be clinically moderate or mild and, conversely, occasional patients with procoagulant activities of 1-5% may have frequent spontaneous bleeds and appear to be clinically severe. This dual classification system has been a source of some confusion, especially in clinical trials where occasional individuals with 2-4% factor levels have been enrolled as severe hemophiliacs. While it is recognized that such individuals may indeed have a phenotypically severe form of hemophilia, the inclusion of these individuals, for example, in studies evaluating the development of antibodies, may confound the results.

Accordingly, the Factor VIII and Factor IX Subcommittee recommends that plasma procoagulant levels, rather than clinical bleeding symptoms, be used preferentially for the classification of hemophilia, with the levels shown in Table 1.

Table 1.
Classification of hemophilia A and hemophilia B

<u>Factor level</u>	<u>Classification</u>
< 0.01 IU/ml (<1% of normal)	severe
0.01 - 0.05 IU/ml (1%-5% of normal)	moderate
> 0.05 - <0.40 IU/ml (>5%-<40 % of normal)	mild

Where normal is 1 IU/ml of factor VIII:C (100%), as defined by the current World Health Organization International Standard for Plasma Factor VIII:C (as distributed by The National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, Hertsfordshire, UK).

^{*} Correspondence to: Gilbert C. White, II, MD, Division of Hematology/Oncology, CB# 7035, UNC School of Medicine, Chapel Hill, NC 27599-7035, tel: 919 966 3311, fax: 919 966 7639, email: gcwhite@med.unc.edu

6.2 Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas



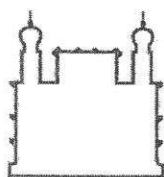
MINISTERIO DA SAUDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP
Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas

PARECER CONSUBSTANCIADO

1. Título do Projeto de Pesquisa: Caracterização Molecular da deficiência hereditária de fator VIII em pacientes hemofílicos do Estado de Minas Gerais		
SUJEITOS DA PESQUISA		
2. Número de sujeitos No Centro: 101 Total: 101	3. Grupos Especiais: Menor de 18 anos (x) Portador de deficiência mental () Embrião/feto () Relação de dependência (militares, presidiários...)() Outros () Não se aplica ()	
PESQUISADOR RESPONSÁVEL		
4. Nome: Suely Meireles Rezende		
5. Instituição a que pertence: Fundação Hemominas		
INSTITUIÇÃO (ÕES) ONDE SERÁ REALIZADO		
6. Nome: Fundação Hemominas		
7. Unidade/Órgão: Hemocentro de Belo Horizonte/Setor de Pesquisa		
8. Participação Estrangeira: Sim () Não (X)		
9. Projeto Multicêntrico: Sim (), Não (X) Nacional (X) Internacional ()		
PATROCINADOR Não se aplica ()		
10. Nome: <i>Fundação Hemominas</i>		
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP		
11. Data de Entrada: <i>16/12/02</i>	12. Registro no CEP: <i>099</i>	13. Data de análise: <i>11/3/03</i>
14. Objetivos: A)Caracterizar as bases moleculares da hemofilia A grave em nossa população de hemofílicos; B)Relacionar os defeitos genéticos encontrados com a evolução natural da doença; C)Proceder ao estudo familiar para aconselhamento genético e redução da propagação da doença D)Estabelecer a prevalência de hemofilia "de novo" na população estudada E)Propor condutas clínicas individualizadas quando aplicáveis F)Formar e aprimorar recursos humanos G)Implementar novas técnicas para pesquisa e propedêutica em hemofilia.		
15. Sumário do Projeto: A hemofilia A é caracterizada pela deficiência na produção do fator VIII da coagulação e pode ser de causa hereditária ou adquirida. Quando de causa hereditária, é uma doença genética causada por mutações no gene que codifica o fator VIII. De acordo com o nível de fator VIII no plasma, a doença é caracterizada em formas leve, moderada e grave (fator VIII 6-30%, 1-5% e menos de 1%, respectivamente). A hemofilia A afeta 1:5000-1:10.000 homens, segundo estatísticas internacionais. Entretanto, os estudos de hemofilia A no Brasil são escassos, e dos existentes, nenhum deles objetivou determinar de forma abrangente as bases moleculares da doença. O estabelecimento das bases moleculares da doença em nossa população permitirá relacionar alguns defeitos genéticos ao desenvolvimento de inibidores de fator VIII e possibilitará a proposição de medidas clínicas e terapêuticas diferenciadas.		
16. Comentário dos Relatores: O projeto está adequado às Normas da Resolução 196/96.		
17. Parecer:		
Aprovado (X)	Pendência ()	Não Aprovado ()
Data: 11/03/2003	Data:	Data:
18. Encaminhamento a CONEP: Os dados acima para registro () O projeto para apreciação () Data:		19. Coordenador

Assinatura
Lúcia Efigênia G. Nunes
Coordenadora Comitê de
Ética em Pesquisa
Fundação Hemominas

6.3 Parecer do Comitê de Ética do Centro de Pesquisa René Rachou



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Comitê de Ética

PARECER Nº 11/2007 – CEPESH- CPqRR

Protocolo CEPESH/CPqRR nº: 04/2006

Projeto de Pesquisa: “Caracterização molecular da deficiência de fator VIII em pacientes hemofílicos do estado de Minas Gerais”

Pesquisador Responsável: Guilherme Corrêa de Oliveira

Instituição: Instituto René Rachou

Data de entrada no CEP: 20/02/2006

Ao se proceder à análise do protocolo em questão, após consideradas as respostas às pendências anteriores, constatou-se que as informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Resolução CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisa René Rachou / FIOCRUZ, de acordo com as atribuições da Resolução 196/96, manifesta-se pela homologação do projeto de pesquisa proposto, bem como do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Situação: **PROJETO APROVADO**

Belo Horizonte, 24 de abril de 2007.

João Carlos Pinto Dias
Coordenador do CEPESH- CPqRR

Dr. João Carlos Pinto Dias
COORDENADOR
COMITÊ DE ÉTICA

6.4 Carta-convite aos possíveis participantes da pesquisa

CARTA-CONVITE

Belo Horizonte, de 20 .

Prezado

Tomo a liberdade de lhe escrever esta carta para convidá-lo a participar de uma pesquisa a ser iniciada na Fundação HEMOMINAS.

Estarei coordenando uma pesquisa que pretende estudar as causas genéticas da hemofilia A para que possamos compreender melhor esta doença em nosso meio. Inicialmente estou convidando os pacientes portadores de **HEMOFILIA A GRAVE**, como é o seu caso.

Vários benefícios serão advindos desta pesquisa, tais como a determinação do defeito genético que causa a sua hemofilia e a determinação da condição de portador do gene da hemofilia no caso de mães, irmãs e outras parentes de hemofílicos. A identificação do defeito genético que causa a sua hemofilia é extremamente importante para avaliar a sua predisposição ao desenvolvimento de inibidores, resposta futura a terapia gênica e aconselhamento genético. Sendo assim, esta pesquisa será importante pois irá trazer enormes benefícios para você e sua família.

Os resultados deste estudo serão mantidos em segredo, podendo ser informados somente a você. Caso sejam apresentados, serão mostrados em conjunto sem dizer que aquele teste é o „seu ou de fulano“.

Para que você seja incluído neste estudo é preciso que você seja examinado por um médico hematologista do ambulatório do HEMOMINAS e que sejam colhidos 5 ml do seu sangue para realização de **exame de DNA** (para que possamos determinar o defeito genético associado à sua hemofilia). **Não é necessário estar em jejum absoluto.**

Sendo assim, solicitamos a você que telefone ao ambulatório da fundação HEMOMINAS (3248 4596) e marque um horário com as secretárias (quando telefonar dizer que a consulta é para participar da pesquisa de hemofilia A grave). Estaremos marcando horários diferentes para facilitar a participação de todos os pacientes e forneceremos atestado de comparecimento para fins de trabalho e/ou escola.

A sua presença é muito importante. Participe!!!

Agradecemos desde já a sua colaboração.

6.5 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



CONSENTIMENTO PARA PESQUISA

Estamos convidando você para participar da pesquisa 'Caracterização molecular da **Deficiência Hereditária de Fator VIII em pacientes Hemofílicos do Estado de Minas Gerais**', para que possamos compreender melhor a hemofilia em nosso meio. A hemofilia A é causada por defeito no gene que é responsável pela formação do fator VIII (o fator que é deficiente no sangue dos hemofílicos A).

Gostaríamos de entender:

- 1- Quais são os defeitos genéticos que levam à hemofilia A grave no nosso meio;
- 2- Qual a relação desses defeitos com a gravidade da doença;

À partir de então poderemos:

- 1-Diagnosticar as mulheres portadoras do gene da hemofilia em sua família;
- 2-Oferecer orientação familiar para as pessoas interessadas da sua família.

A sua participação neste estudo é fundamental e consiste na doação de **um tubo (5 ml no total) de sangue venoso** para que seja realizado **exame de DNA** (para que possamos determinar o defeito genético associado à sua hemofilia).

O único risco para você estará relacionado à coleta de sangue (p. ex. a possibilidade de um hematoma no local da punção venosa). Entretanto, vários benefícios serão advindos desta pesquisa, como dito acima.

Os resultados deste estudo serão mantidos sigilosos, podendo ser informados somente a você. Caso sejam apresentados, serão mostrados em conjunto sem menção de nomes ou quaisquer outros meios que possam identifica-lo.

Eu li e entendi o exposto acima sobre a pesquisa e consinto na minha participação. Tenho liberdade de retirar o meu consentimento em qualquer fase da pesquisa, caso não queira continuar participando da mesma.

Assinatura _____ Data: ___/___/___

Nome do participante: _____ No. Prontuário: _____

Endereço residencial: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Telefone: _____

Endereço profissional: _____ E-mail: _____

Pesquisador

Telefone para contato com o pesquisador: (031) 3248 4586

Telefone para contato com o Comitê de Ética: (031) 3248 4587

6.6 Ficha de Avaliação Clínica



“Caracterização molecular da deficiência hereditária de fator VIII em pacientes hemofílicos do Estado de Minas Gerais”

FORMULÁRIO DE EXAME CLÍNICO

Dados gerais		
Nome:		No. Prontuário.
Data de nascimento:	Cidade onde nasceu:	
Profissão:	Nome da mãe:	
Endereço atual:		CEP.:
Bairro:	Cidade:	Estado:
Telefone/e-mail:		

Dados da doença atual								
Diagnóstico:			certeza? sim () não () Se pendência, qual?					
Hemofilia: grave () moderada () leve () Nível de fator VIII ao diagnóstico:								
Presença de inibidor: sim () não () nunca ()								
Níveis de inibidor (preencher tabela, favor usar outro espaço s/n)								
Data	___/___/___	___/___/___	___/___/___	___/___/___	___/___/___	___/___/___	___/___/___	___/___/___
Inib								
Em programa de terapia domiciliar? sim () não ()			Grupo sanguíneo					
Em uso de aproximadamente _____ unidades de fator VIII (semana/ mês/ano)								
História hemorrágica								
Idade do primeiro sangramento:			Onde?					
Hematomas espontâneos sim () não () nunca ()								
Hemartroses sim () não () nunca ()								
Joelho Direito sim () não () nunca () freqüência _____ (semana/ mês/ano)								
Joelho Esquerdo sim () não () nunca () freqüência _____ (semana/ mês/ano)								
Cotovelo direito sim () não () nunca () freqüência _____ (semana/ mês/ano)								
Cotovelo esquerdo sim () não () nunca () freqüência _____ (semana/ mês/ano)								
Punho direito sim () não () nunca () freqüência _____ (semana/ mês/ano)								
Punho esquerdo sim () não () nunca () freqüência _____ (semana/ mês/ano)								
Ombro direito sim () não () nunca () freqüência _____ (semana/ mês/ano)								
Ombro esquerdo sim () não () nunca () freqüência _____ (semana/ mês/ano)								
Tornozelo direito sim () não () nunca () freqüência _____ (semana/ mês/ano)								
Tornozelo esquerdo sim () não () nunca () freqüência _____ (semana/ mês/ano)								
Outros sangramentos								
1- _____ freqüência _____ (semana/ mês/ano)								
2- _____ freqüência _____ (semana/ mês/ano)								
3- _____ freqüência _____ (semana/ mês/ano)								
Pratica alguma atividade física? Qual?								

História de trombose? sim (..) não () Em caso afirmativo, onde?
Relação com uso de concentrado de fator?

História progressa

Outras doenças: sim () não () Quais?

Uso de medicamentos: sim () não () Quais?

Internações: sim () não () Detalhar:

Cirurgias: sim () não () Quais?

Possui: carro próprio () passe BHTRANS (..) anda a pé () não precisa ()

Perfil sorológico

(realizado a cada seis meses conforme rotina do serviço)

Data do último exame: ___/___/___

Reação de VDRL _____ Sífilis (hemaglutinação indireta) _____

T. cruzi RIF _____ Chagas (hemaglutinação indireta) _____ ELISA _____

HbsAg _____ Anti-Hbc (IgG + IgM) _____ Anti-HCV _____ TGP (U/L) _____

Anti-HIV: ELISA 1 (gag e env de HIV1, env de HIV2) _____

Anti-HIV: ELISA 2 (p24, gp160 e ANT70 de HIV1, env de HIV2) _____

Anti-HTLV I/II (ELISA) _____

Outros

História familiar

1- Outros casos de hemofilia/doença hemorrágica na família? sim () não () não sei ()

2- Citar nomes de outros parentes atendidos no HEMOMINAS

3- Desenhar árvore genealógica e identificar os nomes dos familiares

Exame físico

Cor

Cor da pele na parte anterior do antebraço: branca () marrom () preta ()

Tipo de cabelo: liso () ondulado () encaracolado ()

Cor de cabelo: louro () marrom () preto () vermelho ()

Cor de olhos: azul () verde () marrom () preto ()

Ponta do nariz: proeminente ou voltada p/ cima () deprimida () achatada ()

Lábios: finos () médios () grossos ()

Pulso: _____ PA: _____ Palidez mucocutânea: _____

ACV: Ausculta cardíaca _____

AR: ausculta respiratória _____

Abdômen: fígado _____ baço _____ linfonodos _____

Outros

Seqüelas de hematomas e hemartroses (descrever)

Outras observações

Nome e assinatura do médico:

Data:

7 Referências Bibliográficas

01. Blum L, Nelson W. The antecedents of blood transfer. Bull N Y Acad Med. 1955 Sep;31(9):671-81.
02. Kaadan A.N, Angrini M. Blood tranfusion in history. Allepo: ISHIM, 2009. Disponível em: <http://www.ishim.net/Articles/Blood%20Transfusion%20in%20History.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2009.
03. Izaguirre-Avila R, de Micheli A. Evolution of the knowledge on the blood and its movement. Part two. The knowledge about its composition. Iatrochemistry of the blood. Rev. Invest. Clin. 2005 Jan-Feb;57(1):85-97.
04. Martins e Silva J. From the discovery of the circulation of the blood to the first steps in hemorheology: part 1. Rev Port Cardiol. 2009 Nov;28(11):1245-68.
05. Martins e Silva J. From the discovery of the circulation of the blood to the first steps in hemorheology: part 2. Rev Port Cardiol. 2009 Dec;28(12):1405-39.
06. Forrester J. Malpighi's De polypo cordis: an annotated translation. Med Hist. 1995 Oct;39(4):477-92.
07. Coley N. Early blood chemistry in Britain and France. Clin. Chem. 2001 Dec;47(12):2166-78.
08. Izaguirre-Ávila R. A un siglo de la teoría clásica de la coagulación sanguínea. Rev. mex. anestesiología. 2006;29(2):116-23.
09. Rapaport S. Blood coagulation and its alterations in hemorrhagic and thrombotic disorders. West. J. Med. 1993 Feb;158(2):153-61.
10. Izaguirre Avila R. The centennial of blood coagulation doctrine. Arch Cardiol Mex. 2005 Jul-Sep;75 Suppl 3:S3-118-29.
11. Davie E. A brief historical review of the waterfall/cascade of blood coagulation. J. Biol. Chem. 2003 Dec;278(51):50819-32.
12. Davie E, Ratnoff O. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. Science. 1964 Sep;145:1310-2.
13. Macfarlane R. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. Nature. 1964 May;202:498-9.
14. Spronk HM, Govers-Riemslog JW, Ten Cate H. The blood coagulation system as a molecular machine. Bioessays. 2003 Dec;25(12):1220-8.
15. Riddel JJ, Aouizerat B, Miaskowski C, Lillicrap D. Theories of blood coagulation. J Pediatr Oncol Nurs. 2007 May-Jun;24(3):123-31.
16. Patrushev L. Genetic mechanisms of hereditary hemostasis disorders. Biochemistry Mosc. 2002 Jan;67(1):33-46.

17. Butenas S, Mann K. Blood coagulation. *Biochemistry Mosc.* 2002 Jan;67(1):3-12.
18. Roberts HR, Monroe DM, Hoffman M. Molecular biology and biochemistry of the coagulation factors and pathways of hemostasis. In: Lichtman M A, Beutler E, Kipps T J, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal J, Williams Hematology. Sixth edition. New York: New York: Mc Graw-Hill; 2001.1409-34.
19. Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIII. *Blood Rev.* 2003 Sep;17 Suppl 1:s1-5.
20. Adams RL, Bird RJ. Review article: coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology (Carlton).* 2009 Aug;14(5):462-70.
21. Hoffman M, Monroe Dr. A cell-based model of hemostasis. *Thromb. Haemost.* 2001 Jun;85(6):958-65.
22. Hoffman M. Remodeling the blood coagulation cascade. *J. Thromb. Thrombolysis.* 2003 2003 Aug-Oct;16(1-2):17-20.
23. Colman R. Are hemostasis and thrombosis two sides of the same coin? *J. Exp. Med.* 2006 Mar;203(3):493-5.
24. Adams G, Manson R, Turner I, Sindram D, Lawson J. The balance of thrombosis and hemorrhage in surgery. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2007 Feb;21(1):13-24.
25. Wohner N. Role of cellular elements in thrombus formation and dissolution. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2008 Jul;6(3):224-8.
26. Stassen J, Arnout J, Deckmyn H. The hemostatic system. *Curr. Med. Chem.* 2004 Sep;11(17):2245-60.
27. Galley H, Webster N. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth.* 2004 Jul;93(1):105-13.
28. Kriz N, Rinder C, Rinder H. Physiology of hemostasis: with relevance to current and future laboratory testing. *Clin. Lab. Med.* 2009 Jun;29(2):159-74.
29. Lasne D, Jude B, Susen S. From normal to pathological hemostasis. *Can J Anaesth.* 2006 Jun;53(6 Suppl):S2-11.
30. Ruggeri Z, Mendolicchio G. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ. Res.* 2007 Jun;100(12):1673-85.
31. Ting H, Khasawneh F. Platelet function and Isoprostane biology. Should isoprostanes be the newest member of the orphan-ligand family? *J. Biomed. Sci.* 2010;17(1):24.

32. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*. 2001 Aug;12(5):261-73.
33. De Wit T, van Mourik J. Biosynthesis, processing and secretion of von Willebrand factor: biological implications. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2001 Jun;14(2):241-55.
34. Rondaij M, Bierings R, Kragt A, van Mourik J, Voorberg J. Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2006 May;26(5):1002-7.
35. Kamath S, Lip G. Fibrinogen: biochemistry, epidemiology and determinants. *Q.J.Med*. 2003 Oct;96(10):711-29.
36. Mason R, Saba H. Normal and abnormal hemostasis--an integrated view. A review. *Am. J. Pathol*. 1978 Sep;92(3):775-812.
37. Angiolillo D, Ueno M, Goto S. Basic principles of platelet biology and clinical implications. *Circ. J*. 2010 Mar;74(4):597-607.
38. Andrews R, Berndt M. Platelet adhesion: a game of catch and release. *J. Clin. Invest*. 2008 Sep;118(9):3009-11.
39. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2008 Mar;28(3):403-12.
40. Rivera J, Lozano M, Navarro-Núñez L, Vicente V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica*. 2009 May;94(5):700-11.
41. Hoffman M, Monroe Dr. A cell-based model of hemostasis. *Thromb. Haemost.* 2001 Jun;85(6):958-65.
42. Hoffman MM, Monroe DM. Rethinking the coagulation cascade. *Curr. Hematol. Rep*. 2005 Sep;4(5):391-6.
43. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2002 Sep;22(9):1381-9.
44. Key NS, Geng JG, Bach RR. Tissue factor; from Morawitz to microparticles. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc*. 2007;118:165-73.
45. Butenas S, Orfeo T, Mann KG. Tissue factor in coagulation: Which? Where? When? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2009 Dec;29(12):1989-96.
46. Malý MA, Tomasov P, Hájek P, Blasko P, Hrachovinová I, Salaj P, et al. The role of tissue factor in thrombosis and hemostasis. *Physiol Res*. 2007;56(6):685-95.
47. Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2006 Jan;26(1):41-8.

48. Hoffman M, Monroe DM. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2007 Feb;21(1):1-11.
49. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002 Sep;22(9):1381-9.
50. Roberts HR, Monroe DM, Escobar MA. Current concepts of hemostasis: implications for therapy. *Anesthesiology.* 2004 Mar;100(3):722-30.
51. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br. J. Haematol.* 2005 May;129(3):307-21.
52. Rijken DC, Lijnen HR. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J. Thromb. Haemost.* 2009 Jan;7(1):4-13.
53. Medved L, Nieuwenhuizen W. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin. *Thromb. Haemost.* 2003 Mar;89(3):409-19.
54. Dahlbäck B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood.* 2008 Jul;112(1):19-27.
55. Patnaik MM, Moll S. Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia.* 2008 Nov;14(6):1229-39.
56. Crawley JT, Lane DA. The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008 Feb;28(2):233-42.
57. Dahlbäck B, Villoutreix BO. The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett.* 2005 Jun;579(15):3310-6.
58. Rezende SM, Simmonds RE, Lane DA. Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex. *Blood.* 2004 Feb;103(4):1192-201.
59. Vasse M. Protein Z, a protein seeking a pathology. *Thromb. Haemost.* 2008 Oct;100(4):548-56.
60. Rezaie AR, Bae JS, Manithody C, Qureshi SH, Yang L. Protein Z-dependent protease inhibitor binds to the C-terminal domain of protein Z. *J Biol. Chem.* 2008 Jul;283(29):19922-6.
61. Corral J, González-Conejero R, Hernández-Espinosa D, Vicente V. Protein Z/Z-dependent protease inhibitor (PZ/ZPI) anticoagulant system and thrombosis. *Br. J. Haematol.* 2007 Apr;137(2):99-108.
62. Furlan M. Sticky and promiscuous plasma proteins maintain the equilibrium between bleeding and thrombosis. *Swiss Med Wkly.* 2002 Apr;132(15-16):181-9.
63. Franchini M, Mannucci PM. Interactions between genotype and phenotype in bleeding and thrombosis. *Haematologica.* 2008 May;93(5):649-52.

64. Dahlbäck B. Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *J. Intern. Med.* 2005 Mar;257(3):209-23.
65. Bussel J B, Kunicki T J, Michelson A D. Platelets: New Understanding of Platelet Glycoproteins and Their Role in Disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2002:222-40.
66. McQuaid KE, Keenan AK. Endothelial barrier dysfunction and oxidative stress: roles for nitric oxide? *Exp. Physiol.* 1997 Mar;82(2):369-76.
67. Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2001 Apr;280(4):C719-41.
68. Triplett D. A. Coagulation and bleeding disorders: review and update. *Clin. Chem.* 2000 Aug;46(8 Pt 2):1260-9.
69. Alfirević Z, Alfirević I. Review: Hypercoagulable state, pathophysiology, classification and epidemiology. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2010 Nov.
70. Thomas RH. Hypercoagulability syndromes. *Arch. Intern. Med.* 2001 Nov;161(20):2433-9.
71. Goodeve AC, Rosén S, Verbruggen B. Haemophilia A and von Willebrand's disease. *Haemophilia.* 2010 Jul;16 Suppl 5:79-84.
72. Ingram GI. The history of haemophilia. *J. Clin. Pathol.* 1976 Jun;29(6):469-79.
73. Nossel H L, Archer R K, Macfarlane R G. Equine haemophilia: report of a case and its response to multiple infusions of heterospecific AHG. *Br. J. Haematol.* 1962 Oct;8:335-42.
74. Forbes CD. The early history of hemophilia. In: Forbes CD, Aledort LM, Madhok R, editores. *Hemophilia.* 1st edition. London: Chapman & Hall Medical;1997.P.4-6.
75. Mannucci PM, Tuddenham EG. The hemophilias: progress and problems. *Semin. Hematol.* 1999 Oct;36(4 Suppl 7):104-17.
76. DiMichele D, Neufeld EJ. Hemophilia. A new approach to an old disease. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 1998 Dec;12(6):1315-44.
77. Rogaev EI, Grigorenko AP, Faskhutdinova G, Kittler EL, Moliaka YK. Genotype analysis identifies the cause of the "royal disease". *Science.* 2009 Nov;326(5954):817.
78. Kerr C B. The fortunes of haemophiliacs in the nineteenth century. *Med Hist.* 1963 Oct;7:359-70.
79. Smith K J, Hodges P A. Preparation of pooled cryoprecipitate for treatment of hemophilia A in a home care program. *Transfusion.* 1984 Nov-Dec;24(6):520-3.

80. Pool JG. Preparation and testing of antihemophilic globulin (Factor 8) sources for transfusion therapy in hemophilia. Description of a new sterile concentrate process for blood banks. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1965;17:Suppl 84:70-7.
81. Mannucci PM. Hemophilia and related bleeding disorders: a story of dismay and success. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2002:1-9.
82. Buczma A, Windyga J. Acquired haemophilia. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2007 May-Jun;117(5-6):241-5.
83. Castaldo G, D'Argenio V, Nardiello P, Zarrilli F, Sanna V, Rocino A, Coppola A, Di Minno G, Salvatore F. Haemophilia A: molecular insights. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2007 Jul;45(4):450-61.
84. Bowen DJ. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *MP, Mol. Pathol.* 2002 Apr;55(2):127-44.
85. Bolton-Maggs PH, Pasi KJ. Haemophilias A and B. *Lancet.* 2003 May;361(9371):1801-9.
86. Oldenburg J. Mutation profiling in haemophilia A. *Thromb. Haemost.* 2001 Apr;85(4):577-9.
87. Mannucci PM, Tuddenham EG. The hemophilias--from royal genes to gene therapy. *N. Engl. J. Med.* 2001 Jun;344(23):1773-9.
88. Kembell-Cook G, Tuddenham EG, Wacey AI. The factor VIII Structure and Mutation Resource Site: HAMSTeRS version 4. *Nucleic Acids Res.* 1998 Jan;26(1):216-9.
89. Antonarakis SE. Molecular genetics of coagulation factor VIII gene and haemophilia A. *Haemophilia.* 1998;4 Suppl 2:1-11.
90. Stonebraker JS, Bolton-Maggs PH, Soucie JM, Walker I, Brooker M. A study of variations in the reported haemophilia A prevalence around the world. *Haemophilia.* 2010 Jan;16(1):20-32.
91. Skinner MW, Lillicrap DP, McMillan J, Castro Ozelo M, Pierce GF. What is a cure and how do we get there? *Haemophilia.* 2004 Oct;10 Suppl 4:115-8.
92. Rezende SM, Pinheiro K, Caram C, Genovez G, Barca D. Registry of inherited coagulopathies in Brazil: First report. *Haemophilia.* 2009 Jan;15(1):142-9.
93. Barca D, Rezende SM, Simões BJ, Pinheiro KN, Daisson T, Sternick G, Santo ML, Genovez G. Hemovida Web coagulopatias: um relato do seu processo de desenvolvimento e implantação. *Cad. Saúde Colet.* 2010;85(3):434-44.
94. Keeney S, Mitchell M, Goodeve A, Network UHCDOHGL. The molecular analysis of haemophilia A: a guideline from the UK haemophilia centre doctors' organization haemophilia genetics laboratory network. *Haemophilia.* 2005 Jul;11(4):387-97.

95. Lusher JM. Screening and diagnosis of coagulation disorders. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1996 Sep;175(3 Pt 2):778-83.
96. Chalmers E A. Haemophilia and the newborn. *Blood Rev.* 2004 Jun;18(2):85-92.
97. Handelsman JE. The knee joint in hemophilia. *Orthop. Clin. North Am.* 1979 Jan;10(1):139-73.
98. Rodriguez-Merchan EC. Musculoskeletal Complications of Hemophilia. *HSS J.* 2009 Nov; 6:37-42
99. White GC, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J, et al. Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb. Haemost.* 2001 Mar;85(3):560.
100. Graw J, Brackmann HH, Oldenburg J, Schneppenheim R, Spannagl M, Schwaab R. Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nat. Rev. Genet.* 2005 Jun;6(6):488-501.
101. Schramm W, Royal S, Kroner B, Berntorp E, Giangrande P, Ludlam C, et al. Clinical outcomes and resource utilization associated with haemophilia care in Europe. *Haemophilia.* 2002 Jan;8(1):33-43.
102. Pollmann H, Richter H, Ringkamp H, Jürgens H. When are children diagnosed as having severe haemophilia and when do they start to bleed? A 10-year single-centre PUP study. *Eur. J. Pediatr.* 1999 Dec;158 Suppl 3:S166-70.
103. Kern M, Blanchette V, Stain AM, Einarson TR, Feldman BM. Clinical and cost implications of target joints in Canadian boys with severe hemophilia A. *J. Pediatr.* 2004 Nov;145(5):628-34.
104. Wood K, Omer A, Shaw MT. Haemophilic arthropathy. A combined radiological and clinical study. *Br J Radiol.* 1969 Jul;42(499):498-505.
105. Ljung RC. Intracranial haemorrhage in haemophilia A and B. *Br. J. Haematol.* 2008 Feb;140(4):378-84.
106. Cohen AJ, Kessler CM. Treatment of inherited coagulation disorders. *Am. J. Med.* 1995 Dec;99(6):675-82.
107. Gröner A. Pathogen safety of plasma-derived products - Haemate P/Humate-P. *Haemophilia.* 2008 Nov;14 Suppl 5:54-71.
108. Berntorp E, de Moerloose P, Ljung RC. The role of prophylaxis in bleeding disorders. *Haemophilia.* 2010 Jul;16 Suppl 5:189-93.
109. Blanchette VS. Prophylaxis in the haemophilia population. *Haemophilia.* 2010 Jul;16 Suppl 5:181-8.

110. Feldman BM, Pai M, Rivard GE, Israels S, Poon MC, Demers C, et al. Tailored prophylaxis in severe hemophilia A: interim results from the first 5 years of the Canadian Hemophilia Primary Prophylaxis Study. *J. Thromb. Haemost.* 2006 Jun;4(6):1228-36.
111. Risebrough N, Oh P, Blanchette V, Curtin J, Hitzler J, Feldman BM. Cost-utility analysis of Canadian tailored prophylaxis, primary prophylaxis and on-demand therapy in young children with severe haemophilia A. *Haemophilia.* 2008 Jul;14(4):743-52.
112. Schobess R, Kurnik K, Friedrichs F, Halimeh S, Krümpel A, Bidlingmaier C, et al. Effects of primary and secondary prophylaxis on the clinical expression of joint damage in children with severe haemophilia A. Results of a multicenter non-concurrent cohort study. *Thromb. Haemost.* 2008 Jan;99(1):71-6.
113. Gao X, Ye C, Shi D, Chen L, Qiu X, Xue J. A study of gene transfer and expression of human clotting factor IX in hemophilia B mice mediated by mini-adenoviral vector. *Sci. China, C, Life Sci.* 2003 Dec;46(6):631-40.
114. Murphy SJ, High KA. Gene therapy for haemophilia. *Br. J. Haematol.* 2008 Mar;140(5):479-87.
115. High KA. Update on progress and hurdles in novel genetic therapies for hemophilia. *Br. J. Haematol.* 2008 Mar;140(5):479-87.
116. Blanchette VS, al-Musa A, Stain AM, Filler RM, Ingram J. Central venous access catheters in children with haemophilia. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 1996 Mar;7 Suppl 1:S39-44.
117. Ljung R, van den Berg M, Petrini P, Tengborn L, Scheibel E, Kekomäki R, et al. Port-A-Cath usage in children with haemophilia: experience of 53 cases. *Acta Paediatr.* 1998 Oct;87(10):1051-4.
118. Price VE, Carcao M, Connolly B, Chait P, Daneman A, Temple M, et al. A prospective, longitudinal study of central venous catheter-related deep venous thrombosis in boys with hemophilia. *J. Thromb. Haemost.* 2004 May;2(5):737-42.
119. Journeycake J M, Quinn C T, Miller K L, Zajac JL, Buchanan GR. Catheter-related deep venous thrombosis in children with hemophilia. *Blood.* 2004 Sep;98(6):1727-31.
120. Domm JA, Hudson MG, Janco RL. Complications of central venous access devices in paediatric haemophilia patients. *Haemophilia.* 2003 Jan;9(1):50-6.
121. Asmuth DM, Nguyen HH, Melcher GP, Cohen SH, Pollard RB. Treatments for hepatitis B. *Clin. Infect. Dis.* 2004 Nov;39(9):1353-62.
122. Lederman MM. Haemophilia, human immunodeficiency virus and human immunodeficiency virus pathogenesis. *Thromb. Haemost.* 2010 Nov;104(5):911-4.
123. Ragni MV, Sherman KE, Jordan JA. Viral pathogens. *Haemophilia.* 2010 Jul;16 Suppl 5:40-6.

124. Kessler CM. New perspectives in hemophilia treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005:429-35.
125. Verbruggen B, van Heerde W L, Laros-van Gorkom BA. Improvements in factor VIII inhibitor detection: From Bethesda to Nijmegen. *Semin. Thromb. Hemost.* 2009 Nov;35(8):752-9.
126. Darby SC, Keeling DM, Spooner RJ, Wan Kan S, Giangrande PL, Collins PW, et al. The incidence of factor VIII and factor IX inhibitors in the hemophilia population of the UK and their effect on subsequent mortality, 1977-99. *J. Thromb. Haemost.* 2004 Jul;2(7):1047-54.
127. Coppola A, Santoro C, Tagliaferri A, Franchini M, Di Minno G. Understanding inhibitor development in haemophilia A: towards clinical prediction and prevention strategies. *Haemophilia*. 2010 Jan;16 Suppl 1:13-9.
128. Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia*. 2006 Dec;12 Suppl 6:15-22.
129. Astermark J. Basic aspects of inhibitors to factors VIII and IX and the influence of non-genetic risk factors. *Haemophilia*. 2006 Dec;12 Suppl 6:8-13; discussion -4.
130. Astermark J. Inhibitor development: patient-determined risk factors. *Haemophilia*. 2010 May;16(102):66-70.
131. Oldenburg J, Brackmann HH, Schwaab R. Risk factors for inhibitor development in hemophilia A. *Haematologica*. 2000 Oct;85(10 Suppl):7-13; discussion -4.
132. Peerlinck K, Jacquemin M. Characteristics of inhibitors in mild/moderate haemophilia A. *Haemophilia*. 2006 Dec;12 Suppl 6:43-7.
133. Goodeve AC, Peake IR. The molecular basis of hemophilia A: genotype-phenotype relationships and inhibitor development. *Semin. Thromb. Hemost.* 2003 Feb;29(1):23-30.
134. Giuffrida AC, Genesini S, Franchini M, De Gironcoli M, Aprili G, Gandini G. Inhibitors in mild/moderate haemophilia A: two case reports and a literature review. *Blood Transfus.* 2008 Jul;6(3):163-8.
135. Hay CR, Ludlam CA, Colvin BT, Hill FG, Preston FE, Wasseem N, et al. Factor VIII inhibitors in mild and moderate-severity haemophilia A. UK Haemophilia Centre Directors Organisation. *Thromb. Haemost.* 1998 Apr;79(4):762-6.
136. Gouw S C, van den Berg H M . The multifactorial etiology of inhibitor development in hemophilia: genetics and environment. *Semin. Thromb. Hemost.* 2009 Nov;35(8):723-34.
137. Pavlova A, Delev D, Lacroix-Desmazes S, Schwaab R, Mende M, Fimmers R, et al. Impact of polymorphisms of the major histocompatibility complex class II, interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4

genes on inhibitor development in severe hemophilia A. *J. Thromb. Haemost.* 2009 Dec;7(12):2006-15.

138. Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, Lefvert AK, MIBS Study Group. Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood.* 2006 Apr;107(8):3167-72.

139. Viel K, Ameri A, Abshire T, Iyer R, Watts R, Lutcher C, et al. Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia. *N. Engl. J. Med.* 2009 Apr;360(16):1618-27.

140. ter Avest PC, Fischer K, Mancuso ME, Santagostino E, Yuste VJ, van den Berg HM, van der Bom JG, CANAL Study Group. Risk stratification for inhibitor development at first treatment for severe hemophilia A: a tool for clinical practice. *J. Thromb. Haemost.* 2008 Dec;6(12):2048-54.

141. Lorenzo J I, López A, Altisent C, Aznar J A. Incidence of factor VIII inhibitors in severe haemophilia: the importance of patient age. *Br. J. Haematol.* 2001 Jun;113(3):600-3.

142. van der Bom J G, Mauser-Bunschoten E P, Fischer K, Van den Berg H M. Age at first treatment and immune tolerance to factor VIII in severe hemophilia. *Thromb. Haemost.* 2003 Mar;89(3):475-9.

143. Santagostino E, Mancuso ME, Rocino A, Mancuso G, Mazzucconi MG, Tagliaferri A, et al. Environmental risk factors for inhibitor development in children with haemophilia A: a case-control study. *Br. J. Haematol.* 2005 Aug;130(3):422-7.

144. Gouw S C, van der Bom J G, Marijke van den Berg H. Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study: a case-control study. *Blood.* 2007 Jun;109(11):4648-54.

145. Chalmers E A, Brown S A, Keeling D, Liesner R, Richards M, Stirling D, Thomas A, Vidler V, Williams M D, Young D, Paediatric Working Party of UKHCDO. Early factor VIII exposure and subsequent inhibitor development in children with severe haemophilia A. *Haemophilia.* 2007 Mar;13(2):149-55.

146. Vinciguerrat C, Lambert T, Chambost H, Borel-Derlon A, Claeysens S, Laurian Y, Calvez T, FVIII-LFB and Recombinant FVIII study groups. Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. *Blood.* 2006 Jan;107(1):46-51.

147. Gouw SC, van der Bom JG, Auerswald G, Ettinghausen CE, Tedgård U, van den Berg HM. Recombinant versus plasma-derived factor VIII products and the development of inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood.* 2007 Jun;109(11):4693-7.

148. Gouw S C, van den Berg H M, le Cessie S, Van der Bom J G. Treatment characteristics and the risk of inhibitor development: a multicenter cohort study among previously untreated patients with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 2007 Jul;5(7):1383-90.

149. Sharathkumar A, Lillicrap D, Blanchette V S, Kern M, Leggo J, Stain A M, Brooker L, Carcao M, D. Intensive exposure to factor VIII is a risk factor for inhibitor development in mild hemophilia A. *J. Thromb. Haemost.* 2003 Jun;1(6):1228-36.
150. Chambost H. Assessing risk factors: prevention of inhibitors in haemophilia. *Haemophilia.* 2010 Mar;16 Suppl 2:10-5.
151. Kubisz P, Plamenová I, Hollý P, Stasko J. Successful immune tolerance induction with high-dose coagulation factor VIII and intravenous immunoglobulins in a patient with congenital hemophilia and high-titer inhibitor of coagulation factor VIII despite unfavorable prognosis for the therapy. *Med. Sci. Monit.* 2009 Jun;15(6):CS105-11.
152. DiMichele DM. Immune tolerance: a synopsis of the international experience. *Haemophilia.* 1998 Jul;4(4):568-73.
153. Reipert BM, van Helden PM, van den Helden PM, Schwarz HP, Hausl C. Mechanisms of action of immune tolerance induction against factor VIII in patients with congenital haemophilia A and factor VIII inhibitors. *Br. J. Haematol.* 2007 Jan;136(1):12-25.
154. Lillicrap D. The role of immunomodulation in the management of factor VIII inhibitors. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2006:421-5.
155. Salviato R, Belvini D, Radossi P, Sartori R, Pierobon F, Zanotto D, et al. F8 gene mutation profile and ITT response in a cohort of Italian haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia.* 2007 Jul;13(4):361-72.
156. Hedner U. History of rFVIIa therapy. *Thromb. Res.* 2010 Apr;125 Suppl 1:S4-6.
157. Franchini, M. The use of desmopressin as a hemostatic agent: a concise review. *Am. J. Hematol.* 2007 Aug;82(8):731-5.
158. White G C, Shoemaker C B. Factor VIII gene and hemophilia A. *Blood.* 1989 Jan;73(1):1-12.
159. Lethagen S. Desmopressin in mild hemophilia A: indications, limitations, efficacy, and safety. *Semin. Thromb. Hemost.* 2003 Feb;29(1):101-6.
160. Négrier C, Vinciguerra C, Pinson S, Plauchu H. Hemophilia. Diagnosis, genetics, complications. *Rev Prat.* 1998 Mar;48(6):657-9.
161. Peyvandi F, Jayandharan G, Chandy M, Srivastava A, Nakaya SM, Johnson MJ, et al. Genetic diagnosis of haemophilia and other inherited bleeding disorders. *Haemophilia.* 2006 Jul;12 Suppl 3:82-9.
162. Rosendaal F R, Bröcker-Vriends A H, van Houwelingen J C, Smit C, Varekamp I, van Dijck H, Suurmeijer T P, Vandenbroucke J P, Briët E. Sex ratio of the mutation frequencies in haemophilia A: estimation and meta-analysis. *Hum. Genet.* 1990 Dec;86 (2):139-46.

163. Oldenburg J, Brackmann H H, Hanfland P, Schwaab R. Molecular genetics in haemophilia A. *Vox Sang.* 2000;78 Suppl 2:33-8.
164. Giannelli, F. Haemophilia. Gene mutations and pedigrees. *Lancet.* 2001 Dec;358 Suppl.
165. Costa C, Frances A M, Letourneau S, Girodon-Boulandet E, Goossens M. Mosaicism in men in hemophilia: is it exceptional? Impact on genetic counselling. *J. Thromb. Haemost.* 1998 Feb;7(2):367-9.
166. Leuer M, Oldenburg J, Lavergne J M, Ludwig M, Fregin A, Eigel A, Ljung R, Goodeve A, Peake I, Olek K. Somatic mosaicism in hemophilia A: a fairly common event. *Am. J. Hum. Genet.* 2001Jul;69(1):77-87.
167. Kasper C K, Lin J C. Prevalence of sporadic and familial haemophilia. *Haemophilia.* 2007Jan;13(1):90-2
168. Zlotogora, J. Germ line mosaicism. *Hum. Genet.* 1998 Apr;102(4):381-6.
169. Kasper C K, Buzin C H. Mosaics and haemophilia. *Haemophilia.* 2009 Nov 15(6):1181-6
170. Wellcome Trust Sanger Institute. European Bioinformatics Institute. Transcript: F8001(ENST00000360256). Disponível em http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;q=ENSG00000185010;r=X:154064063154255215;t=ENS00000360256. Acesso em: 08 fev. 2009.
171. Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood.* 1998 Dec;92(11):3983-96.
172. Lynch CM, Israel DI, Kaufman RJ, Miller AD. Sequences in the coding region of clotting factor VIII act as dominant inhibitors of RNA accumulation and protein production. *Hum. Gene Ther.* 1993 Jun;4(3):259-72.
173. Hoeben RC, Fallaux FJ, Cramer SJ, van den Wollenberg DJ, van Ormondt H, Briët E, et al. Expression of the blood-clotting factor-VIII cDNA is repressed by a transcriptional silencer located in its coding region. *Blood.* 1995 May;85(9):2447-54.
174. Figueiredo MS, Brownlee GG. cis-acting elements and transcription factors involved in the promoter activity of the human factor VIII gene. *J. Biol. Chem.* 1995 May;270(20):11828-38.
175. McGlynn LK, Mueller CR, Begbie M, Notley CR, Lillicrap D. Role of the liver-enriched transcription factor hepatocyte nuclear factor 1 in transcriptional regulation of the factor V111 gene. *Mol. Cell. Biol.* 1996 May;16(5):1936-45.
176. Brinke A, Tagliavacca L, Naylor J, Green P, Giangrande P, Giannelli F. Two chimaeric transcription units result from an inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene and a region reportedly affected by reciprocal translocations in T-cell leukaemia. *Hum. Mol. Genet.* 1996 Dec;5(12):1945-51.

177. Venter J C, Adams M D, Myers E W. The sequence of the human genome. *Science*. 2001 Feb;291(5507):1304-51.
178. Wion KL, Kelly D, Summerfield JA, Tuddenham EG, Lawn RM. Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature*. 1985 Oct 24-30;317(6039):726-9.
179. Wood WI, Capon DJ, Simonsen CC, Eaton DL, Gitschier J, Keyt B, et al. Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature*. 1984 Nov 22-28;312(5992):330-7.
180. Bhopale GM, Nanda RK. Blood coagulation factor VIII: An overview. *J. Biosci.* 2003 Dec;28(6):783-9.
181. Fay PJ, Haidaris PJ, Smudzin TM. Human factor VIIIa subunit structure. Reconstruction of factor VIIIa from the isolated A1/A3-C1-C2 dimer and A2 subunit. *J. Biol. Chem.* 1991 May;266(14):8957-62.
182. Fang H, Wang L, Wang H. The protein structure and effect of factor VIII. *Thromb. Res.* 2007;119(1):1-13.
183. Venkateswarlu D. Structural investigation of zymogenic and activated forms of human blood coagulation factor VIII: a computational molecular dynamics study. *BMC Struct. Biol.* 2010;10:7.
184. Foster P A, Zimmerman T S. Factor VIII structure and function. *Blood Rev.* 1989 ;3(3):180-91.
185. Pemberton S, Lindley P, Zaitsev V, Card G, Tuddenham E G, Kemball-Cook G. A molecular model for the triplicated A domains of human factor VIII based on the crystal structure of human ceruloplasmin. *Blood*. 1997 Apr;89(7):2413-21.
186. Fuentes-Prior P, Fujikawa K, Pratt KP. New insights into binding interfaces of coagulation factors V and VIII and their homologues lessons from high resolution crystal structures. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2002 Jun;3(3):313-39.
187. Pipe SW. Functional roles of the factor VIII B domain. *Haemophilia*. 2009 Nov;15(6):1187-96.
188. Lenting PJ, Pegon JN, Christophe OD, Denis CV. Factor VIII and von Willebrand factor--too sweet for their own good. *Haemophilia*. 2010 Jul;16 Suppl 5:194-9.
189. Kane W H, Davie E W. Blood coagulation factors V and VIII: structural and functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders. *Blood*. 1988 Mar;71(3):539-55.
190. Stoilova-McPhie S, Villoutreix BO, Mertens K, Kemball-Cook G, Holzenburg A. 3-Dimensional structure of membrane-bound coagulation factor VIII: modeling of the factor VIII heterodimer within a 3-dimensional density map derived by electron crystallography. *Blood*. 2002 Feb;99(4):1215-23.

191. Stubbs J D, Lekutis C, Singer K L, Bui A, Yuzuki D, Srinivasan U, Parry G, . cDNA cloning of a mouse mammary epithelial cell surface protein reveals the existence of epidermal growth factor-like domains linked to factor VIII-like sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990 Nov;87(21):8417-21.
192. Takagi S, Hirata T, Agata K, Mochii M, Eguchi G, Fujisawa H. The A5 antigen, a candidate for the neuronal recognition molecule, has homologies to complement components and coagulation factors. *Neuron.* 1991 Aug;7(2):295-307.
193. Johnson JD, Edman JC, Rutter WJ. A receptor tyrosine kinase found in breast carcinoma cells has an extracellular discoidin I-like domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993 Nov;90(22):10891.
194. Ngo JC, Huang M, Roth DA, Furie BC, Furie B. Crystal structure of human factor VIII: implications for the formation of the factor IXa-factor VIIIa complex. *Structure.* 2008 Apr;16(4):597-606.
195. Saenko EL, Ananyeva NM, Tuddenham EG, Kemball-Cook G. Factor VIII - novel insights into form and function. *Br. J. Haematol.* 2002 Nov;119(2):323-31.
196. Pipe SW, Morris JA, Shah J, Kaufman RJ. Differential interaction of coagulation factor VIII and factor V with protein chaperones calnexin and calreticulin. *J Biol. Chem.* 1998 Apr;273(14):8537-44.
197. Scheifflinger F, Dorner F. Recent advances in the understanding of the molecular biology of hemophilia A: possible implications towards a more effective therapeutic regime. *Wien Klin Wochenschr.* 1999 Mar;111(5):172-80.
198. Zhang B, Cunningham MA, Nichols WC, Bernat JA, Seligsohn U, Pipe SW, et al. Bleeding due to disruption of a cargo-specific ER-to-Golgi transport complex. *Nat. Genet.* 2003 Jun;34(2):220-5.
199. Ginsburg D, Nichols WC, Zivelin A, Kaufman RJ, Seligsohn U. Combined factors V and VIII deficiency--the solution. *Haemophilia.* 1998 Jul;4(4):677-82.
200. Cunningham MA, Pipe SW, Zhang B, Hauri HP, Ginsburg D, Kaufman RJ. LMAN1 is a molecular chaperone for the secretion of coagulation factor VIII. *J. Thromb. Haemost.* 2003 Nov;1(11):2360-7.
201. Thompson AR. Structure and function of the factor VIII gene and protein. *Semin. Thromb. Hemost.* 2003 Feb;29(1):11-22.
202. Kaufman RJ, Pipe SW, Tagliavacca L, Swaroop M, Moussalli M. Biosynthesis, assembly and secretion of coagulation factor VIII. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 1997 Dec;8 Suppl 2:S3-14.
203. Saenko E L, Shima M, Sarafanov A G, . Role of activation of the coagulation factor VIII in interaction with vWf, phospholipid, and functioning within the factor Xase complex. *Trends Cardiovasc. Med.* 1999 Oct; 9(7):185-92.

204. Ananyeva NM, Kouivaskaia DV, Shima M, Saenko EL. Catabolism of the coagulation factor VIII: can we prolong lifetime of f VIII in circulation? *Trends. Cardiovasc. Med.* 2001 Aug;11(6):251-7.
205. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature.* 1984 Nov 22-28;312(5992):326-30.
206. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 1987;155:335-50.
207. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1977 Dec;74(12):5463-7.
208. Kembell-Cook G. HAMSTeR: Haemophilia A Mutation Database and a resource. London: HADB, 2010. Disponível em <http://hadb.org.uk/>. Acesso em : 25 jul 2009.
209. Cooper DN, Ball EV, Stenson PD, Phillips AD, Howells K, Mort ME, Thomas NST. The Human Gene Mutation Data Base. [s.l]: Cardiff University/Institute of Medical Genetics, 2005. Disponível em: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php> . Acesso em: 10 abr. 2009.
210. Mantilla-Capacho JM, Beltrán-Miranda CP, Luna-Záizar H, Aguilar-López L, Esparza-Flores MA, López-Guido B, et al. Frequency of intron 1 and 22 inversions of Factor VIII gene in Mexican patients with severe hemophilia A. *Am. J. Hematol.* 2007 Apr;82(4):283-7.
211. Lakich D, Kazazian HJ, Antonarakis S, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat. Genet.* 1993 Nov;5(3):236-41.
212. Rossiter JP, Young M, Kimberland ML, Hutter P, Ketterling RP, Gitschier J, et al. Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. *Hum. Mol. Genet.* 1994 Jul;3(7):1035-9.
213. Bagnall R, Waseem N, Green P, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood.* 2002 Jan;99(1):168-74.
214. Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, Horst J, de Moerloose P, Sommer SS, et al. Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study. *Blood.* 1995 Sep;86(6):2206-12.
215. Bagnall R, Giannelli F, Green P. Int22h-related inversions causing hemophilia A: a novel insight into their origin and a new more discriminant PCR test for their detection. *J. Thromb. Haemost.* 2006 Mar;4(3):591-8.
216. Leiria L, Roisenberg I, Salzano F, Bandinelli E. Introns 1 and 22 inversions and factor VIII inhibitors in patients with severe haemophilia A in southern Brazil. *Haemophilia.* 2009 Jan;15(1):309-13.

217. Castaman G, Giacomelli S, Ghiotto R, Boseggia C, Pojani K, Bulo A, et al. Spectrum of mutations in Albanian patients with haemophilia A: identification of ten novel mutations in the factor VIII gene. *Haemophilia*. 2007 May;13(3):311-6.
218. Sukarova Stefanovska E, Dejanova V, Tchakarova P, Petkov G, Efremov G. Genetic inversions among hemophilia A patients from Macedonia and Bulgaria. *Acta Haematol*. 2008;120(3):192-4.
219. Habart D, Kalabova D, Hrachovinova I, Vorlova Z. Significant prevalence of the intron 1 factor VIII gene inversion among patients with severe hemophilia A in the Czech Republic. *J. Thromb. Haemost*. 2003 Jun;1(6):1323-4.
220. Poláková H, Kádasi L, Filová A. Factor VIII gene inversions in haemophilia A patients of Slovakia. *Hum. Hered*. 1998 1998 Jan-Feb;48(1):34-7.
221. Guillet B, Lambert T, d'Oiron R, Proulle V, Plantier J, Rafowicz A, et al. Detection of 95 novel mutations in coagulation factor VIII gene F8 responsible for hemophilia A: results from a single institution. *Hum. Mutat*. 2006 Jul;27(7):676-85.
222. Repessé Y, Slaoui M, Ferrandiz D, Gautier P, Costa C, Costa J, et al. Factor VIII (FVIII) gene mutations in 120 patients with hemophilia A: detection of 26 novel mutations and correlation with FVIII inhibitor development. *J. Thromb. Haemost*. 2007 Jul;5(7):1469-76.
223. Schröder J, El-Maarri O, Schwaab R, Müller C, Oldenburg J. Factor VIII intron-1 inversion: frequency and inhibitor prevalence. *J. Thromb. Haemost*. 2006 May;4(5):1141-3.
224. Andrikovics H, Klein I, Bors A, Nemes L, Marosi A, Váradi A, et al. Analysis of large structural changes of the factor VIII gene, involving intron 1 and 22, in severe hemophilia A. *Haematologica*. 2003 Jul;88(7):778-84.
225. Salviato R, Belvini D, Radossi P, Tagariello G. Factor VIII gene intron 1 inversion: lower than expected prevalence in Italian haemophiliac severe patients. *Haemophilia*. 2004 Mar;10(2):194-6.
226. Riccardi F, Tagliaferri A, Manotti C, Pattacini C, Neri T. Intron factor VIII gene inversion in a population of Italian hemophilia A patients. *Blood*. 2002 Nov;100(9):3432.
227. Margaglione M, Castaman G, Morfini M, Rocino A, Santagostino E, Tagariello G, et al. The Italian AICE-Genetics hemophilia A database: results and correlation with clinical phenotype. *Haematologica*. 2008 May;93(5):722-8.
228. Aquila M, Pasino M, Lanza T, Bottini F, Boeri E, Bicocchi M. Frequency of factor VIII intron 1 inversion in a cohort of severe hemophilia A Italian patients. *Haematologica*. 2003 May;88(5):ELT17.
229. David D, Ventura C, Moreira I, Diniz M, Antunes M, Tavares A, et al. The spectrum of mutations and molecular pathogenesis of hemophilia A in 181 Portuguese patients. *Haematologica*. 2006 Jun;91(6):840-3.

230. Strmecki L, Benedik-Dolnicar M, Vidan-Jeras B, Komel R. Inversions of the factor VIII gene in Slovenian patients with severe haemophilia A. *Eur J Haematol.* 1999 Jul;63(1):64-6.
231. Tizzano E, Domènech M, Altisent C, Tusell J, Baiget M. Inversions in the factor VIII gene in Spanish hemophilia A patients. *Blood.* 1994 Jun;83(12):3826.
232. Tizzano E, Cornet M, Baiget M. Inversion of intron 1 of the factor VIII gene for direct molecular diagnosis of hemophilia A. *Haematologica.* 2003 Jan;88(1):118-20.
233. Casaña P, Cabrera N, Cid A, Haya S, Beneyto M, Espinós C, et al. Severe and moderate hemophilia A: identification of 38 new genetic alterations. *Haematologica.* 2008 Jul;93(7):1091-4.
234. Cumming A, Network UHCDOHGL. The factor VIII gene intron 1 inversion mutation: prevalence in severe hemophilia A patients in the UK. *J. Thromb. Haemost.* 2004 Jan;2(1):205-6.
235. Hill M, Deam S, Gordon B, Dolan G. Mutation analysis in 51 patients with haemophilia A: report of 10 novel mutations and correlations between genotype and clinical phenotype. *Haemophilia.* 2005 Mar;11(2):133-41.
236. Pehlivan M, Pehlivan S, Buyukkececi F, Çagirgan S, Yilmaz M, Bedii Omay S, et al. Factor VIII-inversion of hemophilia A patients in west Anatolia. *BJMG.* 2007;10(1):49-50.
237. Ahmed R, Kannan M, Choudhry V, Saxena R. Mutation reports: intron 1 and 22 inversions in Indian haemophilics. *Ann. Hematol.* 2003 Sep;82(9):546-7.
238. Rastegar Lari G, Enayat M, Arjang Z, Lavergne J, Ala F. Identification of intron 1 and 22 inversion mutations in the factor VIII gene of 124 Iranian families with severe haemophilia A. *Haemophilia.* 2004 Jul;10(4):410-1.
239. Fukuda K, Naka H, Morichika S, Shibata M, Tanaka I, Shima M, et al. Inversions of the factor VIII gene in Japanese patients with severe hemophilia A. *Int. J. Hematol.* 2004 Apr;79(3):303-6.
240. El-Maarri O, Kavakli K, Caglayan S. Intron 22 inversions in the Turkish haemophilia A patients: prevalence and haplotype analysis. *Haemophilia.* 1999 May;5(3):169-73.
241. Rossetti L, Radic C, Candela M, Pérez Bianco R, de Tezanos Pinto M, Goodeve A, et al. Sixteen novel hemophilia A causative mutations in the first Argentinian series of severe molecular defects. *Haematologica.* 2007 Jun;92(6):842-5.
242. Figueiredo M, Tavella M, Simões B. Large DNA inversions, deletions, and TaqI site mutations in severe haemophilia A. *Hum. Genet.* 1994 Nov;94(5):473-8.
243. Soares R, Chamone D, Bydlowski S. Factor VIII gene inversions and polymorphisms in Brazilian patients with haemophilia A: carrier detection and prenatal diagnosis. *Haemophilia.* 2001 May;7(3):299-305.

244. Laurie A, Sheen C, Hanrahan V, Smith M, George P. The molecular aetiology of haemophilia A in a New Zealand patient group. *Haemophilia*. 2007 Jul;13(4):420-7.
245. Uen C, Oldenburg J, Schröder J, Brackmann H J, Schramm W, Schwaab R, Schneppenheim R, Graw J. 2% Haemophilia A patients without mutation in the FVIII gene. *Hamostaseologie*. 2003 Feb;23(1):1-5.
246. El-Maarri O, Herbiniaux Graw J, Schröder J, Terzic A, Watzka M, Brackmann H H, Schramm W, Hanfland P, Schwaab R. Analysis of mRNA in hemophilia A patients with undetectable mutations reveals normal splicing in the factor VIII gene. *J Thromb. Haemost.* 2005 Feb;3(2):332-9.
247. Zhang B, Ginsburg D. Familial multiple coagulation factor deficiencies: new biologic insight from rare genetic bleeding disorders. *J. Thromb. Haemost.* 2004 Sep;2(9):1564-72.
248. Ruggeri, Z. M. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thromb. Res.* 2007;120 Suppl 1:S5-9.
249. Mazurier C, Hilbert L. Type 2N von Willebrand disease. *Curr. Hematol. Rep.* 2005 Sep;4(5):350-8.
250. Schneppenheim R, Budde U, Krey S, Drewke E, Bergmann F, Lechler E, et al. Results of a screening for von Willebrand disease type 2N in patients with suspected haemophilia A or von Willebrand disease type 1. *Thromb. Haemost.* 1996 Oct;76(4):598-602.
251. Dargaud Y, Meunier S, Negrier C. Haemophilia and thrombophilia: an unexpected association! *Haemophilia*. 2004 Jul;10(4):319-26.
252. Di Perna C, Franchini M, Riccardi F, Rivolta G F, Angeri F, Tagliaferri A. Association between haemophilia and inherited thrombophilia: a single centre survey. *Haemophilia*. 2011 Jan;17(1):161-2.
253. van Dijk K, van der Bom J G, Fischer K, Grobbee D E, van den Berg H M, . Do prothrombotic factors influence clinical phenotype of severe haemophilia? A review of the literature. *Thromb. Haemost.* 2004 Aug;92(2):305-10.
254. Jayandharan G R, Nair S C, Poonnoose P M, Thomas R, John J, Keshav S K, Cherian R S, Devadarishini M, Lakshmi K M, Shaji R V, Viswabandya A, George B, Mathews V, Chandy M, Srivastava A. Polymorphism in factor VII gene modifies phenotype of severe haemophilia. *Haemophilia*. 2009 Nov;15(6):1228-36.
255. van Dijk K, van der Bom JG, Lenting PJ, de Groot PG, Mauser-Bunschoten EP, Roosendaal G, et al. Factor VIII half-life and clinical phenotype of severe hemophilia A. *Haematologica*. 2005 Apr;90(4):494-8.
256. Tagariello G, Belvini D, Salviato R, Are A, De Biasi E, Goodeve A, et al. Experience of a single Italian center in genetic counseling for hemophilia: from linkage analysis to molecular diagnosis. *Haematologica*. 2000 May;85(5):525-9.

257. Miller R. Counselling about diagnosis and inheritance of genetic bleeding disorders: haemophilia A and B. *Haemophilia*. 1999 Mar;5(2):77-83.
258. Spiegel PC, Murphy P, Stoddard BL. Surface-exposed hemophilic mutations across the factor VIII C2 domain have variable effects on stability and binding activities. *J. Biol. Chem.* 2004 Dec;279(51):53691-8.
259. Oldenburg J, Ivaskevicius V, Rost S, Fregin A, White K, Holinski-Feder E, et al. Evaluation of DHPLC in the analysis of hemophilia A. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2001 Jan;47(1-2):39-51.
260. Habart D, Kalabova D, Novotny M, Vorlova Z. Thirty-four novel mutations detected in factor VIII gene by multiplex CSGE: modeling of 13 novel amino acid substitutions. *J. Thromb. Haemost.* 2003 Apr;1(4):773-81.
261. Alexandre CO, Roisenberg I. A genetic and demographic study of hemophilia A in Brazil. *Hum. Hered.* 1985;35(4):250-4.
262. Roisenberg I, Morton N. Genetic aspects of hemophilias A and B in rio Grande do sul. *Hum. Hered.* 1971;21(2):97-107.
263. Arruda VR, Annichino-Bizzacchi JM, Sonati MeF, Costa FF. Factor VIII and IX genes polymorphisms in a Brazilian black population. *Thromb. Haemost.* 1993 Aug;70(2):371.
264. Arruda VR, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF. Detection of hemophilia A gene carriers in a Brazilian population]. *Rev Assoc Med Bras.* 1993 1993 Jul-Sep;39(3):126-30.
265. Arruda VR, Pieneman WC, Reitsma PH, Deutz-Terlouw PP, Annichino-Bizzacchi JM, Briët E, et al. Eleven novel mutations in the factor VIII gene from Brazilian hemophilia A patients. *Blood*. 1995 Oct;86(8):3015-20.
266. De Carvalho FM, de Vargas Wolfgramm E, Paneto GG, de Paula Careta F, Spagnol Perrone AM, de Paula F, et al. Analysis of Factor VIII polymorphic markers as a means for carrier detection in Brazilian families with haemophilia A. *Haemophilia*. 2007 Jul;13(4):409-12
267. Chaves D G, Velloso-Rodrigues C, Moreau V, Nguyen C, Villard S, Belisário A R, Granier C, Santoro M M. Reactivity profile of anti-factor VIII antibodies with designed synthetic peptides mimicking epitopes of the C2 and a1 domains. *Br J Haematol.* 2008 May;141(5):708-15.
268. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 302, de 14 de outubro de 2005. Dispõe sobre regulamento técnico para funcionamento de laboratórios clínicos. Brasília, 2005. 33 p. Disponível em: http://portal2.saude.gov.br/saudelegis/leg_norma_espelho_consulta.cfm?id=4016870&highlight=&bkp=pesqnorma&fonte=0&origem=0&sit=0&assunto=&qtd=10&tipo_norma=&numero=302&data=&dataFim=&ano=2005&pag=1# . Acesso em: 15 dez. 2010.

269. Bowen D, Keeney S. Unleashing the long-distance PCR for detection of the intron 22 inversion of the factor VIII gene in severe haemophilia A. *Thromb. Haemost.* 2003 Jan;89(1):201-2.
270. Pio SF, Mühle C, Oliveira GC, Rezende SM. Detection of int1h-related inversion of the factor VIII gene. *Haemophilia.* 2011 Mar;17(2):313-4
271. Rossetti L, Radic C, Larripa I, De Brasi C. Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR. *Clin. Chem.* 2005 Jul;51(7):1154-8.
272. Rosenthal A, Coutelle O, Craxton M. Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. *Nucleic Acids Res.* 1993 Jan;21(1):173-4.
273. Life Technologies. Applied Biosystem. Software downloads: DNA sequencing: Sequence Scanner Software. [s.l]: AB, 2010. Disponível em: <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/support/software/.html>. Acesso em: 15 dez. 2010.
274. Hepperle HD. Sequentix Software: software for Sequence Assembly, Sequence Alignment, Phylogenetic Tree Visualization, Fingerprint Analyses, Klein Raden: SequentiX Digital DNA Processing, 2008. Disponível em http://www.sequentix.de/software_download.php?app=SeqAssem. Acesso em: 20 maio 2010.
275. Horaitis R, Den Dunnen J.T. Nomenclature for the description of sequence variants: last modified june 15, 2007. [s.l.]: Human Genomic Variation Society, 2010. Disponível em <http://www.hgvs.org/mutnomen/recs-DNA.html>. Acesso em: 20 fev. 2009.