DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE HEMOFILIA A NUM GRUPO DE INDIVÍDUOS ESTUDADOS NO CENTRO HOSPITALAR DE COIMBRA

- DESCRIÇÃO DE 23 NOVAS MUTAÇÕES

Catarina Isabel Rodrigues da Silva Pinto

2009

Departamento de Zoologia

Faculdade de Ciências e Tecnologia
Universidade de Coimbra

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE HEMOFILIA A NUM GRUPO DE INDIVÍDUOS ESTUDADOS NO CENTRO HOSPITALAR DE COIMBRA

- DESCRIÇÃO DE 23 NOVAS MUTAÇÕES

Catarina Isabel Rodrigues da Silva Pinto

2009

Departamento de Zoologia
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Universidade de Coimbra

Em colaboração com:

Centro de Hemofília
Centro Hospitalar de Coimbra, E.P.E.

Dissertação elaborada para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular, apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

AGRADECIMENTOS

À Doutora Maria Letícia Ribeiro pela oportunidade de me deixar desenvolver este trabalho ao longo destes muitos anos, pela sua disponibilidade, extraordinário espírito crítico e rigor científico.

Ao Dr. Gabriel Tamagnini, pela ideia do projecto aqui apresentado, pelo seu empenho em criar as condições que o tornaram possível e pela oportunidade que me deu de iniciar o seu desenvolvimento.

À Mestre Teresa Fidalgo pela excepcional orientação científica e auxílio na elaboração da Tese de Dissertação, pela infinita disponibilidade, pelos esclarecimentos e ensinamentos que me transmitiu e pelo incentivo, infindável apoio, força e amizade que nunca faltaram.

Ao Ramón Salvado, pela paciência, extraordinária amizade e carinho, pela disponibilidade permanente e pelos fantásticos momentos de descontração que proporcionou.

À Dra. Paula Pina Cabral pela excepcional amizade e carinho, pelo apoio, incentivo e, não poucas vezes, porto de abrigo.

À Dra. Natália Martins, pela colaboração na recolha de informação clínica e na obtenção de amostras de doentes, cujos resultados apresento neste trabalho.

Às minhas Colegas da Unidade de Hemostase e Hemostase Molecular, por toda a ajuda, carinho e amizade.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra, comigo colaboraram tornando possível a elaboração deste trabalho.

Aos meus Pais e à minha Mana, pelo apoio que não faltou ao longo dos anos em que este projecto se desenvolveu.

Ao meu Pai e à minha Mãe,

À minha Mana

Abreviaturas

A	Resíduo de nucleótido contendo como base a adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucléico complementar
ADP	Adenosina difosfato
AG	Aparelho de Golgi
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensageiro
ASPCR	Amplificação por PCR Alelo Específico
AT	Antitrombina
BiP	Proteína de ligação à Imunoglobulina
C	Resíduo de nucleótido contendo como base a citosina
CES	Células endoteliais sinusoidais
cm	Centímetro
CRM	Material de reacção cruzada
ddATP	5' - trifosfato de didesoxiadenosina
ddCTP	5' - trifosfato de didesoxicitosina
ddGTP	5' - trifosfato de didesoxiguanosina
ddNTP	5' - trifosfato de didesoxinucleótido
ddTTP	5' - trifosfato de didesoxitimina
DMSO	Dimetilsulfóxido
dATP	5' - trifosfato de desoxiadenosina
dCTP	5' - trifosfato de desoxicitosina
dGTP	5' - trifosfato de desoxiguanosina
dNTP	5' - trifosfato de desoxinucleótido
DPN	Diagnóstico prénatal
DvW	Doença de von Willebrand
dTTP	5' - trifosfato de desoxitimina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	*Enzyme Linked Imunosorbent Assay*
ERGIC	Compartimento Intermediário Retículo Endoplasmático-Golgi
FT	Factor tecidular

FV	Factor V
FVa	Factor V activado
FVII	Factor VII
FVIIa	Factor VII activado
FVIII	Factor VIII
FVIIIa	Factor VIII activado
FVIII:Ag	Factor VIII antigénico
FVIII:C	Factor VIII plasmático
FIX	Factor IX
FIXa	Factor IX activado
FX	Factor X
FXa	Factor X activado
FXI	Factor XI
FXII	Factor XII
F8	Gene do Factor VIII
FvW	Factor von Willebrand
FvW:Act	Actividade do Factor de von Willebrand
FvW:Ag	Factor de von Willebrand antigénico
G	Resíduo de nucleótido contendo como base a guanina
GP	Glicoproteína
HA	Hemofilia A
HB	Hemofilia B
ISTH	Sociedade Internacional de Trombose e Hemostase
IVS1	Inversão do intrão 1 do gene *F8*
IVS22	Inversão do intrão 22 do gene *F8*
LASER	Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação
LMAN1	Ligação Lectina, Manose, 1
Kb	Kilobase
kDa	Kilo Daltons
mARN	Ácido ribonucleico mensageiro
MCFD2	Proteína da Deficiência Múltipla de Factores da Coagulação 2
MoAb	Anticorpo monoclonal
MLPA	Amplificação múltipla de fragmentos dependente de ligação

nm	Nanómetros
Nt	Nucleótido
PC	Proteína C
PCA	Proteína C activada
PCR	Reacção da polimerase em cadeia
p. ex.	Por exemplo
PK	Proteinase K
PL	Fosfolípidos
POP	*Performance Optimized Polymer*
PS	Proteína S
QAPM	Quininogénio de alto peso molecular
RE	Retículo endoplasmático
ra1	Região acídica 1
ra2	Região acídica 2
ra3	Região acídica 3
SDS	Dodecilsulfato de sódio
STR	*Short Tandem R*epeat
T	Resíduo de nucleótido contendo como base a timina
Taq	ADN polimerase (*Thermophilus aquaticus*)
TAT	Complexo Trombina-Antitrombina
TBE	Tris borato EDTA
TE	Tris EDTA
TFPI	Inibidor do Factor Tecidular
T*m*	Temperatura de *melting*
TMB	Tetrametilbenzidina
TP	Tempo de protrombina
t-PA	Activador tecidular do plasminogénio
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial activada
UB	Unidades Bethesda
UV	Ultra-violeta
V	Volts

RESUMO

Introdução: A Hemofilia A (HEMA; OMIM +306700) é uma coagulopatia hemorrágica resultante da diminuição dos níveis de FVIII plasmático (FVIII:C) devido a defeitos qualitativos ou quantitativos. Tem severidade heterogénea, transmissão recessiva ligada ao cromossoma X e afecta, aproximadamente, 1 em cada 5000 indivíduos do sexo masculino.

O FVIII circula no plasma ligado ao Factor de von Willebrand (FvW) e actua como co-factor do Factor IX activado (FIXa) permitindo a formação do complexo tenase, que converte o Factor X (FX) em FX activado (FXa). Anomalias deste complexo levam à produção de uma quantidade reduzida de trombina, à dificuldade na formação do coágulo para encerrar as lesões vasculares e, consequentemente, à diátese hemorrágica.

A Hemofilia A (HA) é classificada como severa quando os níveis de FVIII circulante são inferiores a 1% (0.01 UI/mL), moderada se estão entre 1 e 5% (0.01 – 0.05 UI/mL) e ligeira se são superiores a 6% (0.06 UI/mL). Na grande maioria dos doentes há uma correlação directa entre a actividade do FVIII:C no plasma e a severidade das manifestações hemorrágicas.

O défice de FVIII é devido a mutações no gene *F8* localizado no braço longo do cromossoma X (Xq28). O gene *F8*, com186 Kb, tem 26 exões que codificam uma proteína precursora com 2351 resíduos aminoacídicos, 19 dos quais constituem o péptido sinal. A proteína FVIII tem uma estrutura com 3 domínios proteicos A homólogos, 2 domínios C homólogos e 1 domínio B único e pequenas regiões acídicas entre os domínios A e B, organizados numa sequência A1-*a1*-A2-*a2*-B-*a3*-A3-C1-C2.

Na HA severa a Inversão do intrão 22 (IVS22) e a Inversão do intrão 1 (IVS1) são responsáveis por cerca de 40-50% e 5 % dos casos, respectivamente. As mutações *missense* são mais frequentes nos doentes com fenótipos moderado e ligeiro. A presença de factores de risco protrombótico, como o Factor V Leiden ou a variante da Protrombina G20210A, podem suavizar o quadro clínico.

Objectivos: Pesquisar as alterações moleculares responsáveis pelo fenótipo de Hemofilia A em 103 famílias, identificar as mulheres portadoras de modo a poder oferecer o diagnóstico prénatal, estabelecer a relação genótipo/fenótipo e identificar factores moduladores do fenótipo em doentes com Hemofilia A severa. Atendendo à extensão e complexidade do gene *F8*, o primeiro objectivo foi implementar e optimizar novas metodologias de identificação de mutações e estabelecer uma estratégia de diagnóstico eficaz.

Material e Métodos: Foram estudados 141 doentes com HA pertencentes a 103 famílias aparentemente não relacionadas (52 severos, 7 moderados, 44 ligeiros). Noventa e nove doentes (64 famílias) são seguidos no Centro de Hemofilia do Centro Hospitalar de Coimbra, 42 são seguidos noutras Instituições que enviaram as respectivas amostras e a informação clínica. O grau de severidade da HA foi estabelecido de acordo com os critérios da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostase (ISTH).

As inversões do intrão 22 (IVS22) e intrão 1 (IVS1) foram pesquisadas por PCR longo e PCR *multiplex*, respectivamente. As outras mutações foram identificadas por PCR/Sequenciação nucleotídica directa da região promotora, exões e regiões intrónicas flanqueantes, e pela técnica de MLPA.

Resultados: Em 102/103 famílias com hemofilia A foram identificadas 46 mutações diferentes, 23 das quais não referenciadas no reportório internacional HAMSTeRS (11 mutações *missense*, 2 *nonsense*, 3 *splicing*, 1 pequena inserção, 3 pequenas

delecções, 2 grandes delecções e 1 duplicação parcial do gene). Em doentes com fenótipo severo foram identificados com maior frequência os rearranjos IVS22 e IVS1 (28/52). As 11 *frameshifts* identificadas estão associadas a fenótipos severos, excepto a delecção c.3637delA (p.1194*fs*X4) que foi encontrada num doente com fenótipo ligeiro. Estudos complementares efectuados sugerem a presença de mosaicismo.

A mutação IVS25+1 G>C, num local de consenso para *splicing*, foi identificada num doente com um fenótipo ligeiro (FVIII:C 12%).

Foi possível identificar e confirmar 2 grandes delecções e 1 duplicação parcial do gene *F8* e encontrar as mulheres portadoras destas mutações através da técnica de MLPA. Em cerca de 62% das famílias com fenótipos moderados e ligeiros foram identificadas mutações *missense* de transição. A mutação p.Gln2189Glu é a mais prevalente neste grupo de indivíduos (15/50). Foram realizados 129 estudos de portadoras, dos quais 83 revelaram heterozigotia para a mutação do familiar afectado, e 14 diagnósticos prénatais, dos quais 6 revelaram presença de mutação no feto.

Um doente com FVIII:C <1%, portador da mutação p.Leu71Pro, com homozigotia para a mutação FV Leiden, apresentava um quadro hemorrágico menos severo do que o esperado, apenas com necessidade de 2 a 3 tratamento substitutivos por ano, em situações traumáticas.

Os 5 Hemofílicos A severos com inibidores para o FVIII são hemizigóticos para IVS22 (n=2), IVS1 (n=2) e grande delecção da Região Promotora – Exão 3 (n=1). O hemofílico com fenótipo ligeiro, que desenvolveu inibidores após tratamento para cirurgia *major*, é portador de uma mutação *missense* num local que codifica para uma região localizada perto do epítopo inibitório no domínio C2 do FVIII.

Conclusão: A estratégia e a metodologia desenvolvidas neste trabalho, sumarizadas no algoritmo apresentado, permitiram, de uma forma eficaz, identificar as mutações associadas à HA em 102 famílias (23 das quais não previamente descritas no HAMSTeRS), identificar portadoras e efectuar 14 diagnósticos prénatais. A correlação entre o genótipo e o fenótipo mostrou 3 situações em que, tendo em conta as mutações identificadas, o quadro clínico era menos severo do que o esperado: um doente com FVIII:C 15% portador da pequena delecção c.3637delA (p.1194*fs*X4), um doente com FVIII:C 12% e a mutação de *consensus splicing* IVS25+1 G>C, e um doente FVIII:C<1% e a mutação p.Leu71Pro e que é homozigótico para o Factor V Leiden.

ABSTRACT

Introduction: Haemophilia A (HEMA; OMIM +306700) is a hemorrhagic disorder caused by coagulation Factor VIII (FVIII) decreased activity. It is an X-linked recessive disorder with heterogeneous severity and affects 1 in 5000 males. FVIII circulates in plasma attached to the von Willebrand Factor and is a cofactor for activated Factor IX allowing the Tenase complex assembly, which activates Factor X. Abnormalities of this complex lead to reduced amounts of thrombin generation, inadequate clot formation and bleeding diathesis. Haemophilia A (HA) is classified according to the FVIII:C plasmatic level: severe when it is less than 0,01 UI/mL, moderate between 0,01- 0,05 UI/mL and mild if it is higher than 0,06 UI/mL. In the majority of patients the clinical severity correlates with the level of FVIII activity detected in the plasma.

FVIII deficiency is due to mutations in the *F8* gene that is located on the most distal band of chromosome X (Xq28). It spans over 186 Kb and comprises 26 exons encoding a polypeptide chain of 2351 aminoacids, including a signal peptide of 19 aminoacids. FVIII protein is a large multidomain glycoprotein containing 3 homologous A domains, 2 homologous C domains, a B domain and small acidic regions located between the A and B domains defining A1-*a1*-A2-*a2*-B-*a3*-A3-C1-C2 domain sequence.

The severe phenotype in HA is mainly due to IVS22 and IVS1 rearrangements, accounting for 40-50% and 5% respectively. Moderate and mild phenotypes arise more frequently from single base substitutions. Coinheritance of prothrombotic risk factors, like Factor V Leiden or the Prothrombin G20210A variant, may be important modulating factors in haemophilia A severe patients.

Objectives: To identify the molecular lesions underlying Haemophilia A in 103

families, the female carrier status identification to perform antenatal diagnosis when indicated, to establish the genotype/phenotype correlation and to identify modulating factors in severe Haemophilia A patients. Due to FVIII gene large dimension and complexity, the primary goal was to implement and optimize new methodologies to identify the mutations and to establish an efficient investigation strategy.

Materials and Methods: After informed consent, the study enrolled 141 patients belonging to 103 apparently unrelated families with haemophilia A (52 severe, 7 moderate and 44 mild). Ninety-nine patients (64 families) regularly attend the Centro de Hemofilia do Centro Hospitalar de Coimbra and 42 others were referred by other hospitals. All patients enrolled were classified according to ISTH criteria.

Intron 22 (IVS22) and intron 1 (IVS1) inversions were analysed by Long Distance-PCR and multiplex PCR, respectively; other mutations were identified by promoter, exons and flanking splicing regions direct sequencing and by the MLPA technique.

Results: In 102/103 families with Haemophilia A 46 different mutations were identified (23 had not been reported in HAMSTeRS): 11 *missense* mutations, 2 *nonsense*, 3 *splicing*, 1 small insertion, 3 small deletions, 2 large deletions and 1 parcial gene duplication. The severe phenotype was mainly due to IVS22 and IVS 1 (28/52). Eleven *framshift* mutations were identified in patients with severe phenotype, except the deletion c.3637delA p.1194*fs*X4 that is associated with a mild phenotype in one patient. Complementary studies suggest a mosaicism phenomenon. A *consensus splicing* mutation (IVS25+1 G>C) was identified in a patient with a mild phenotype.

The MLPA technique made possible the identification and confirmation of 2 large deletions, 1 partial gene duplication and the carrier status assessment among women from these families. In 62% of the families with moderate and mild phenotypes *missense* transitional mutations were present. Mutation p.Gln2189Glu

was the most frequent in this group (15/50). One hundred and twenty-nine women were assessed for carrier status and 83 turned out heterozygous for the mutation of the affected family member and 14 prenatal diagnoses were carried out. In 6 cases the male foetuses were found to carry the mother's mutation. One patient with FVIII:C < 0,01 UI/mL, carrying mutation p.Leu71Pro in the *F8* gene, homozygous for the FV Leiden mutation, behaves has a moderate to mild, needing only 2-3 substitution treatments *per* year.

Five patients who developed inhibitory antibodies against FVIII have the IVS22 (n=2), IVS1 (n=2) and a large deletion (n=1). One patient with a mild phenotype, who developed inhibitors after substitution treatment for major surgery, is hemizygous for mutation p.Gln2246Arg located in a sequence coding for a region lying near an important antigenic determinant in the C2 domain.

Conclusions: The strategy and methodology developed in this study, summarized in the algorithm presented, allowed the identification of mutations underlying Haemophilia A in 102 families (23 not previously reported in HAMSTeRS), females carrier status determination and 14 prenatal diagnosis. Genotype/phenotype correlation revealed 3 cases were the clinical picture was less severe than expected based on the type of mutation identified: one patient with FVIII:C 15% carrying the small deletion c.3637delA (p.1194*fs*X4), one patient with FVIII:C 12% and the consensus splicing mutation IVS25+1 G>C and another patient with FVIII:C <1%, carrying mutation p. Leu71Pro and the Factor V Leiden mutation in the homozygous state.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS iii

ABREVIATURAS v

RESUMO viii

ABSTRACT xii

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO 2

1. HEMOSTASE 2

1.1. Resposta hemostática 2

1.2. Factores procoagulantes 7

1.2.1. Modelo clássico da coagulação – "Cascata" da coagulação 7

1.2.2. Modelo celular da coagulação 9

1.2.3. Factor VIII 11

1.2.3.1. Complexo Factor VIII – Factor von Willebrand 11

1.2.3.2. Estrutura antigénica do Factor VIII 12

1.2.3.3. Função do Factor VIII no Complexo "Tenase" 14

1.2.3.4. Síntese e Secreção do Factor VIII 15

1.2.3.5. Activação proteolítica e Inactivação do Factor VIII 16

2. DEFICIÊNCIA CONGÉNITA DE FACTOR VIII 18

2.1. Hemofilia A 18

2.1.1. Hereditariedade da Hemofilia A 19

2.1.2. Gene do Factor VIII: Estrutura e localização 20

2.1.3. Mutações no Gene do Factor VIII 21

2.1.4. Estudo de portadoras e Diagnóstico prénatal 23

2.1.5. Genes moduladores do fenótipo Hemofilia A 24

2.1.6. Inibidores específicos para Factor VIII 26

3. OBJECTIVOS DO TRABALHO 27

CAPÍTULO II – MATERIAL E MÉTODOS 28

1. POPULAÇÃO ESTUDADA 30

2. COLHEITA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS 31

3. MÉTODOS 31

3.1. Estudos Funcionais e Imunológicos 31

3.1.1. Testes de rastreio 31

3.1.1.1. Determinação do Tempo de Tromboplastina Parcial Activada 31

3.1.2. Testes confirmatórios ... 31
3.1.2.1. Doseamento de Factor VIII por método coagulante ... 31
3.1.2.2. Doseamento de Factor VIII por substratos cromogénicos ... 32
3.1.2.3. Doseamento de Factor de von Willebrand antigénico e determinação da actividade do Factor de von Willebrand ... 33
3.1.2.4. Doseamento de Factor VIII antigénico ... 34
3.1.2.5. Pesquisa de inibidores e doseamento pelo método Bethesda/Nijmegen ... 35
3.2. Estudos Moleculares ... 36
3.2.1. Extracção de ADN pelo método de *salting-out* ... 36
3.2.2. Extracção de ADN por *kit* comercial (Jetquick, Genomed, GmbH) ... 38
3.2.3. Extracção de ADN genómico de líquido amniótico ... 39
3.2.4. Extracção de ARNm por *kit* comercial ... 40
3.2.5. Determinação Espectrofotométrica da Quantidade de ADN ... 41
3.2.6. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Convencional ... 42
3.2.7. Transcrição Reversa do ARNm Extraído ... 44
3.3. Estudos moleculares do Gene F8 ... 44
3.3.1. PCR Longo - Inversão do intrão 22 do gene F8 ... 44
3.3.2. PCR *Multiplex* - Inversão do intrão 1 do gene F8 ... 47
3.3.3. Amplificação e sequenciação do gene *F8* - PCR da região promotora, regiões exónicas e intrónicas flaqueantes ... 48
3.3.3.1. Purificação com ExoSAP-IT® ... 49
3.3.3.2. Sequenciação cíclica de ADN ... 50
3.3.3.3. Electroforese capilar no sequenciador automático ... 52
3.3.3.4. Análise de sequências - Comparação dos dados obtidos com a sequência nativa do *F8* (GeneBank) ... 53
3.3.4. Análise de Fragmentos ... 54
3.3.5. Pesquisa de grandes delecções/duplicações por Amplificação de Múltiplos Fragmentos dependentes de ligação de sonda (MLPA) ... 55
3.4. Pesquisa de factores moduladores de fenótipo - FV Leiden e PRT G20210A por Allele Specific PCR Multiplex (ASPCR) ... 56
3.5. PCR exões 18 a 27 do gene FvW – Exclusão DvW tipo 2N ... 57
3.6. Modulação Molecular ... 57
3.7. Diagnóstico de Hemofilia A ... 59

CAPÍTULO III - RESULTADOS ... *60*

1. RESULTADOS DOS ESTUDOS MOLECULARES ... 61
1.1. Estudo Funcional, Imunológico e Molecular de 23 Novas Mutações ... 61
1.2. Inversão do intrão 22 e Inversão do intrão 1 ... 64
1.3. Mutações Pontuais - Mutações Missense ... 65
1.4. Mutações Pontuais - Mutações Nonsense ... 67
1.5. Mutações Pontuais - Mutações Splicing ... 67

1.6. Pequenas delecções e inserções 68
1.7. Grandes delecções 69
1.8. Duplicação parcial do gene F8 71

2. ESTUDOS DE PORTADORA E DIAGNÓSTICO PRÉNATAL 72

3. FACTORES MODULADORES DO FENÓTIPO 73

4. INIBIDORES ESPECÍFICOS PARA O FACTOR VIII 73

5. DISTRIBUIÇÃO DAS MUTAÇÕES POR FENÓTIPO 74

6. ESTRATÉGIA DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE HEMOFILIA A - ALGORITMO DE ESTUDO 75

CAPÍTULO IV – DISCUSSÃO *77*

1. NOVAS MUTAÇÕES 79

2. INVERSÃO DO INTRÃO 22 E INVERSÃO DO INTRÃO 1 80

3. MUTAÇÕES PONTUAIS – MUTAÇÕES *MISSENSE* 81

4. MUTAÇÕES PONTUAIS – MUTAÇÕES *NONSENSE* 82

5. MUTAÇÕES PONTUAIS – MUTAÇÕES *SPLICING* 83

6. PEQUENAS DELECÇÕES E INSERÇÕES 83

7. GRANDES DELECÇÕES E DUPLICAÇÃO PARCIAL DO GENE *F8* 84

8. MODULAÇÃO DO FENÓTIPO 85

9. INIBIDORES ESPECÍFICOS PARA O FACTOR VIII 86

10. AUSÊNCIA DE MUTAÇÕES NO GENE *F8* 87

CAPÍTULO V – CONCLUSÃO *88*

CAPÍTULO VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *91*

Capítulo I

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

O sistema hemostático é um mecanismo complexo e eficiente capaz de estancar hemorragias reparando de imediato as lesões vasculares através da produção de um coágulo. Do funcionamento coordenado e equilibrado de todos os componentes dos sistemas procoagulante, anticoagulante e fibrinolítico depende a manutenção do estado de fluidez do sangue e a integridade do sistema vascular.

A ausência, a diminuição ou a alteração conformacional de uma das proteínas envolvidas na formação do coágulo – factores da coagulação – compromete a formação da rede de fibrina que estabiliza o tampão plaquetar no local da lesão. Os indivíduos com diminuição da actividade dos factores da coagulação têm clínica hemorrágica, de severidade heterogénea.

A Hemofilia A (HEMA; OMIM +306700), causada por uma diminuição dos níveis de FVIII plasmático (FVIII:C) resultante de defeitos qualitativos ou quantitativos, é uma coagulopatia hemorrágica recessiva de transmissão ligada ao cromossoma X. Afecta, aproximadamente, 1 em cada 5000 indivíduos do sexo masculino [1] e, muito raramente, mulheres [2, 3].

1. HEMOSTASE

1.1. Resposta hemostática

O equilíbrio do sistema hemostático depende da integridade da parede dos vasos sanguíneos, do número e função das plaquetas e dos factores plasmáticos da coagulação. A resposta fisiológica a uma lesão vascular termina na produção rápida de trombina nesse local, levando a um aumento da deposição de plaquetas e à formação de uma rede insolúvel de fibrina [4]. A resposta do mecanismo de

coagulação é geralmente limitada ao local da lesão e é proporcional, em magnitude, à extensão dos danos vasculares. Estas propriedades requerem que as reacções que a constituem funcionem de forma localizada, amplificada e controlada [4]. A hemostase definitiva é atingida quando é induzida a retracção do coágulo pelas plaquetas [5].

A hemostase pode ser dividida em três fases: hemostase primária, secundária e terciária.

Na hemostase primária a resposta imediata a lesões vasculares é a vasoconstrição local e dos vasos adjacentes. A diminuição do fluxo sanguíneo na área da lesão permite a activação das plaquetas e dos factores de coagulação por contacto. A adesão das plaquetas ao local da lesão vascular é potenciada pelo FvW que forma uma ponte entre as plaquetas através do complexo glicoprotéico Ib/V/IX, e o subendotélio. As plaquetas expostas ao colagénio e à trombina activam-se e sintetizam tromboxano A2, libertam o conteúdo dos seus grânulos (ADP, serotonina, fibrinogénio, cofactores e enzimas), e agregam através da ligação do fibrinogénio aos receptores GP IIb/IIIa. A formação do tampão plaquetar é suficiente para permitir o controlo da hemorragia por um curto período de tempo. A activação das plaquetas está associada à exposição de fosfolípidos com carga negativa (fosfatidilserina), que apresentam um elevado potencial para ligar factores da coagulação e associar complexos enzima-cofactor, cruciais para a propagação eficiente da coagulação [6].

Ao processo de estabilização do coágulo chama-se hemostase secundária. Paralelamente à formação do tampão plaquetar, a lesão vascular desencadeia as reacções sequenciais em que substâncias iniciadoras activam, por proteólise, um conjunto de proteínas precursoras (factores enzimáticos da coagulação sob a forma de zimogénios) e que culmina na activação da trombina, que converte o fibrinogénio

em fibrina. Este conjunto de reacções requer concentração dos factores da coagulação no local da lesão e é mediado pela exposição de colagénio, fosfolípidos plaquetares e factor tecidular [5].

Para que o coágulo não se propague indefinidamente, a produção de fibrina deve ser limitada ao local da lesão, o que é assegurado por uma série de proteínas que se ligam às enzimas da coagulação inactivando-as. A primeira destas proteínas a ser activada é, provavelmente, o inibidor do factor tecidual (TFPI) que vai quelar o complexo FT-FVII, iniciador da coagulação. A trombina é um elemento chave na hemostase. Tem propriedades procoagulantes, quando converte o fibrinogénio em fibrina insolúvel, activa e agrega as plaquetas, e em reacções de *feedback* positivo activa o FVIII e o FV. Em contraste, a trombina ao ligar-se com alta afinidade à trombomodulina, uma proteína de membrana das células endoteliais, activa a proteína C adquirindo assim propriedades anticoagulantes. A proteína C activada (PCA) cliva e inactiva as formas activadas dos factores V e VIII. O efeito anticoagulante da PCA é potencializado pelo seu cofactor, proteína S, que tem alta afinidade para as cargas negativas dos fosfolípidos. A concentração da proteína S no plasma é de 20 a 25 mg/L; circula livre (40%) ou ligada a uma proteína reguladora do sistema clássico do complemento, C4BP (C4b-*binding protein*). Só a forma livre actua como cofactor da proteína C activada, na inactivação do FVa e FVIIIa.

O principal inibidor fisiológico da trombina é a antitrombina (AT) que se liga à protrombina formando um complexo inactivo antitrombina-trombina (TAT). Este complexo é potencializado pela presença de heparina. A AT é responsável por 60% da capacidade de inactivação da trombina circulante no plasma. A restante é inibida pelo cofactor da heparina II e por inibidores menos específicos como a α2

macroglobulina. A AT tem também a capacidade de inactivar, embora em menor grau, os factores X, IX, XI e XII [9].

A fibrinólise (hemostase terciária) desempenha um papel importante na dissolução do coágulo de fibrina e no controlo da fibrina formada, mantendo o sistema vascular desobstruído [5, 7, 8]. O processo de degradação proteolítica da fibrina é iniciado com a activação da proenzima plasminogénio em plasmina, pelos activadores da parede do vaso sanguíneo (activação intrínseca) ou dos tecidos (activação extrínseca). A activação da fibrinólise pela via intrínseca, que envolve os factores XII, XI, QAPM e pré-calicreína, é menos relevante do que a activação pela via extrínseca, através da libertação do t-PA (Activador do Plasminogénio tipo tecidular) pelas células endoteliais. O t-PA liga-se à fibrina e potencia a conversão do plasminogénio em plasmina. Esta dependência de fibrina pelo t-PA localiza a geração de plasmina ao coágulo de fibrina [5, 7]. A regulação e o controlo do sistema fibrinolítico são conseguidos através dos activadores e inibidores envolvidos no processo [8].

Tabela I: Proteínas da coagulação [7, 9].

Factor	Local de Síntese	Características proteicas	Forma activa/função	Concentração plasmática	Localização cromossómica	Organização génica
Fibrinogénio (Factor I)	Hepatócito	Dímero	Fibrina	200-400 mg/dL	4	Genes separados para as cadeias α,β e γ
Protrombina (Factor II)	Hepatócito	Dependente de vitamina K	Protease serínica	100 μg/mL	11	14 exões
Factor tecidular (Factor III)	Vários tipos de células	Proteína transmembranar	Receptor/cofactor	0	1	6 exões
Factor IV (Cálcio)	-	-	-	-	-	-
Factor V (Proacelerina)	Hepatócito Megacariócito		Cofactor do factor Xa	10 μg/mL	1	Semelhante ao FVIII
Factor VII (Proconvertina)	Hepatócito	Dependente de vitamina K	Protease serínica	0,5 μg/mL	13	9 exões
Factor VIII (Factor anti-hemofílico)	Hepatócito CES	-	Cofactor do factor IXa	0,2 μg/mL	X	26 exões
Factor IX (Factor de Christmas)	Hepatócito	Dependente de vitamina K	Protease serínica	5 μg/mL	X	8 exões
Factor X (Factor de Stuart-Prower)	Hepatócito	Dependente de vitamina K	Protease serínica	10 μg/mL	13	8 exões
Factor XI (Antecedente da tromboplastina plasmática)	Hepatócito	Homodímero	Protease serínica	5 μg/mL	4	15 exões
Factor XII (Factor de Hageman)	Hepatócito	Cadeia polipeptídica simples	Protease serínica	30 μg/mL	5	15 exões
Factor XIII (Factor estabilizador da fibrina)	Hepatócito	Tetrâmero	Transglutaminase	10 μg/mL	1 (gene B); 6 (gene A)	Genes A e B em cromossomas diferentes
Pré-Kalicreína (Factor de Fletcher)	Hepatócito	Cadeia polipeptídica simples	Protease serínica	50 μg/mL	4	Não determinada
Kininogénio de alto peso molecular (Factor de Fitzgerald)	Hepatócito	Cadeia polipeptídica simples	Cofactor do FXIa e Pré-Kalicreína	70 μg/mL	3	11 exões
Factor de von Willebrand	Célula endotelial e megacariócito	Múltimeros de alto peso molecular	Transportador plasmático do FVIII	10 μg/mL	12	52 exões; pseudogene no cromossoma 3
Proteína C	Hepatócito	Dependente de vitamina K	Protease serínica	5 μg/mL	2	8 exões
Proteína S	Hepatócito	Dependente de vitamina K	Cofactor da Proteína C	25 μg/mL	3	15 exões; pseudogene no cromossoma 3
Antitrombina III	Hepatócito	Forma complexos com a heparina	Protease serínica	150 μg/mL	1	6 exões
Trombomodulina	Célula endotelial	Expressa na superfície do endotélio	Receptor	0	20	Sem intrões

1.2. Factores procoagulantes

1.2.1. Modelo clássico da coagulação – "Cascata" da coagulação

O modelo clássico da "cascata" da coagulação, é uma série de reacções proteolíticas sequenciais, constituído pelas vias intrínseca, extrínseca e comum (Figura 1.1) e, suporta os testes laboratoriais de primeira linha, o tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial activada (Figura 1.1).

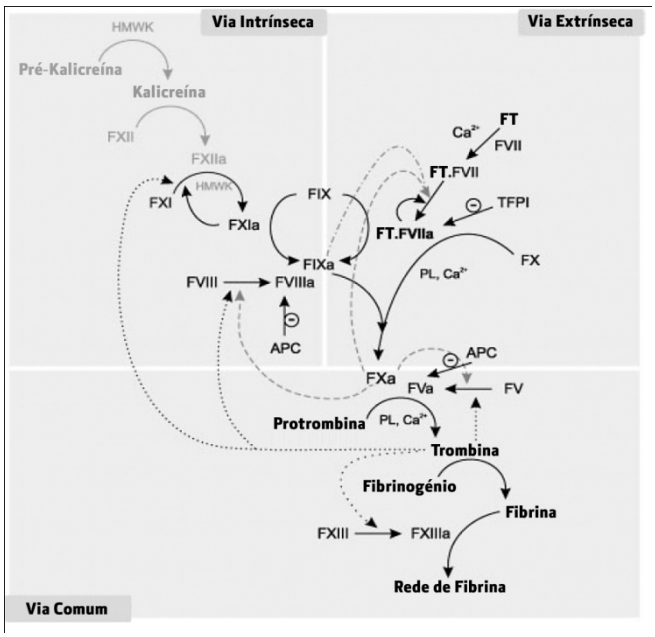

Figura 1.1: Modelo clássico da coagulação. Adaptado de [8].

A via intrínseca é iniciada com activação do FXII pela calicreína, reacção catalizada pelo QAPM, em superfícies com carga negativa [10]. O FXIIa, conjuntamente com a trombina converte o FXI na sua forma activa [11]. Na presença de cálcio, o FXIa converte o FIX em FIXa, o qual com o cofactor FVIIIa (complexo "tenase") activa o FXa. A via extrínseca, iniciada pela formação do complexo FT-FVIIa na superfície das células, com o cofactor FVa – complexo "protrombinase" vai também activar o FXa. Os cofactores FVIIIa e FVa, encontram-se ligados às superfícies membranares e ambos actuam na presença de cálcio. Os complexos

enzimáticos -“tenase” e “protrombinase”- promovem em conjunto a activação do FXa que vai converter a protrombina em trombina iniciando-se a polimerização do fibrinogénio [11] gerando assim o coágulo de fibrina, o qual é estabilizado pelo FXIII após polimerização dos monómeros de fibrina.

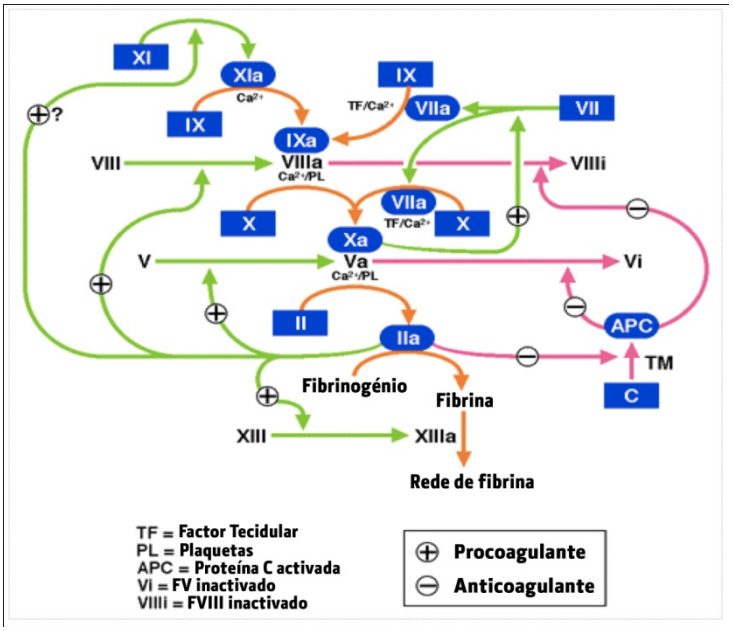

Figura 1.2: Hemostase – mecanismos procoagulantes e anticoagulantes. (Retirado e adaptado de [12])

O modelo clássico da coagulação não explica de forma adequada os mecanismos que conduzem à hemostase *in vivo* [13]. Em particular, não explica porque certos indivíduos revelam tendência hemorrágica, nem permite, correctamente, saber que indivíduos realmente correm o risco de sangrar [13]. O modelo de hemostase baseado nas células substitui o modelo clássico da cascata da coagulação.

1.2.2. Modelo celular da coagulação

O modelo conceptual da hemostase, que confere um papel central a superfícies celulares específicas no controlo e direccionamento do processo hemostático, permite uma melhor aproximação às alterações fisiopatológicas *in vivo*. Neste modelo a hemostase ocorre em três etapas sobreponíveis – iniciação, amplificação e propagação, que têm lugar na superfície de diferentes tipos de células, como as plaquetas e as células que expressam FT (fibroblastos, monócitos, eritrócitos), em restos celulares e microvesículas que derivam de células activadas [8,13].

O complexo FT-FVIIa é o mais potente activador da coagulação. Em condições fisiológicas circula no plasma uma pequena quantidade de FVIIa (~1% do total de FVII em circulação). A origem e a função desta pequena quantidade de FVIIa não estão devidamente esclarecidas [11].

A fase de iniciação ocorre com a exposição de FT que vai formar um complexo catalítico com o FVIIa (complexo FT-FVIIa) numa superfície fosfolipídica, activando pequenas quantidades de FX e FIX. O FXa com o seu cofactor, FVa, forma os complexos “protrombinase” na superfície das células que expressam FT [14]. Na fase de amplificação a trombina gerada vai activar plaquetas que expõem locais de ligação para factores da coagulação activados, os cofactores FV e FVIII e FXI, de forma a preparar a produção de uma grande quantidade de trombina [14]. Durante a fase de propagação, que ocorre na superfície das plaquetas activadas, é fornecido mais FIXa via FXIa ligado às plaquetas. O FIXa associa-se com o FVIIIa na presença de cálcio, formando o complexo “tenase”. Este complexo vai concentrar FX na superfície da plaqueta, que é rapidamente activado. O FXa associa-se com o FVa ligado à plaqueta durante a fase de amplificação [14]. A formação do complexo

"protrombinase" produz um aumento de geração de trombina com magnitude suficiente para produzir fibrina. O polímero de fibrina é estabilizado pelo FXIII, tornado insolúvel a rede de fibrina.

A interacção entre os factores de coagulação depende, basicamente, de uma superfície fosfolipídica. A co-localização destes componentes tem um efeito potenciador no processo de coagulação acelerando a taxa de activação do FX e a formação de trombina [8].

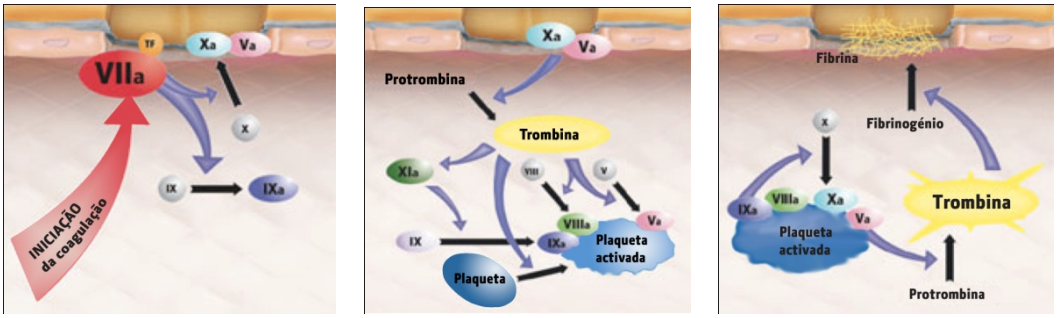

Figura 1.3: Representação esquemática do mecanismo de coagulação *in vivo*. (Retirado e adaptado de http://www.frca.co.uk)

Através deste modelo, a Hemofilia A (défice de FVIII) pode ser explicada por uma falha na concentração e activação do FX e consequente diminuição da geração de trombina ao nível da superfície plaquetar na fase de propagação do processo hemostático [13].

1.2.3. Factor VIII

A concentração de FVIII no plasma é reduzida (0,2 μg/mL) mas assegura uma adequada função procoagulante em indivíduos normais. Circula no plasma associado ao Factor von Willebrand (FvW), num complexo não-covalente que o protege contra a proteólise [15-18]. Esta associação, via interacções hidrofóbicas e hidrofílicas, é mantida até à activação do FVIII pela trombina.

1.2.3.1. Complexo Factor VIII – Factor von Willebrand

O FVIII e o FvW são duas glicoproteínas distintas, mas relacionadas, que circulam no plasma ligadas entre si formando um complexo proteico. O FvW é uma proteína multimérica plasmática, com propriedades adesivas, essencial na hemostase primária [19]. É produzido nos megacariócitos (precursores das plaquetas) e nas células endoteliais, onde é encontrado nos corpos de Weibel-Palade [20]. Existe também nos grânulos α das plaquetas, no plasma e subendotélio. Desempenha um duplo papel no processo hemostático: promove a adesão plaquetar a superfícies trombogénicas e a agregação plaquetar durante a formação do coágulo e é um transportador plasmático de FVIII, prolongado a sua semi-vida plasmática e possibilitando a sua actividade na geração de trombina [18, 19]. A ligação do FVIII ao FvW é essencial à sobrevivência do FVIII *in vivo* [17, 18], protegendo-o da proteólise dependente de fosfolípidos por acção da PCA e da activação pelo FXa [18, 21].

A deficiência do FvW causa a Doença de von Willebrand (DvW), a patologia hemorrágica congénita mais comum, com uma prevalência estimada de 1-2% [22, 23]. A DvW, fenotipicamente heterogénea, é classificada actualmente em 3 grandes

tipos (Subcomité Científico do FvW da *International Society on Thrombosis and Haemostasis* (ISTH)), com base em critérios clínicos e laboratoriais: tipo 1 – deficiência quantitativa parcial do FvW, tipo 3 ausência total do FvW e tipo 2 – deficiência qualitativa do FvW, que por sua vez se subdivide em 4 subtipos: 2A, 2B, 2M e 2N. A DvW tipo 2N, doença autossomica recessiva, é caracterizada por um défice de ligação do FvW ao FVIII [22, 24].

1.2.3.2. Estrutura antigénica do Factor VIII

O FVIII é constituído por 2332 aminoácidos distribuídos por 6 domínios estruturais organizados na sequência (NH_2) A1-A2-B-A3-C1-C2 (COOH), com 3 regiões ricas em aminoácidos acídicos (*ra1*, *ra2* e *ra3*) entre os domínios A1 e A2, A2 e B e B e A3, respectivamente [21, 25]. Possui 3 domínios A homólogos a regiões do factor V (FV) e da ceruloplasmina (proteína que liga iões metálicos), 2 domínios C que partilham cerca de 20% de homologia com uma região de uma aglutinina celular (discoidina) pertencente ao fungo *Dictyostelium discoideum* capaz de ligar lípidos e um domínio B, de grande dimensão, [20] que não apresenta homologia com quaisquer outras estruturas e que apresenta locais de glicosilação (figura 1.4). Os 3 tipos de domínio encontram-se ligados por cálcio. Os dois domínios C constituem uma superfície para ligação a lípidos e um local secundário para a ligação do FvW.

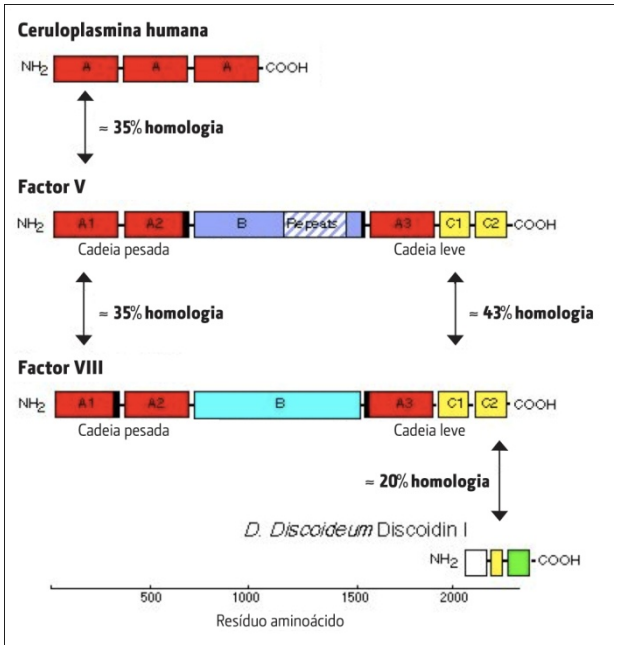

Figura 1.4: Graus de homologia existentes entre a ceruloplasmina humana, FV e FVIII. (Retirado e adaptado de http://blood.uvm.edu/lab/eversebio.html)

O FVIII é constituído por uma cadeia leve de tamanho constante e que é formada pelos domínios A3-C1-C2 (80 kDa) e uma cadeia pesada que compreende os domínios A1 e A2 mais uma porção do domínio B (90 a 200 kDa). As duas cadeias encontram-se ligadas de forma não-covalente por iões metálicos divalentes com os resíduos responsáveis pela ligação nos domínios A1 e A3 [20]. O FVIII liga-se, através da sua cadeia leve, ao FvW perto da extremidade amínica (Figura 1.5).

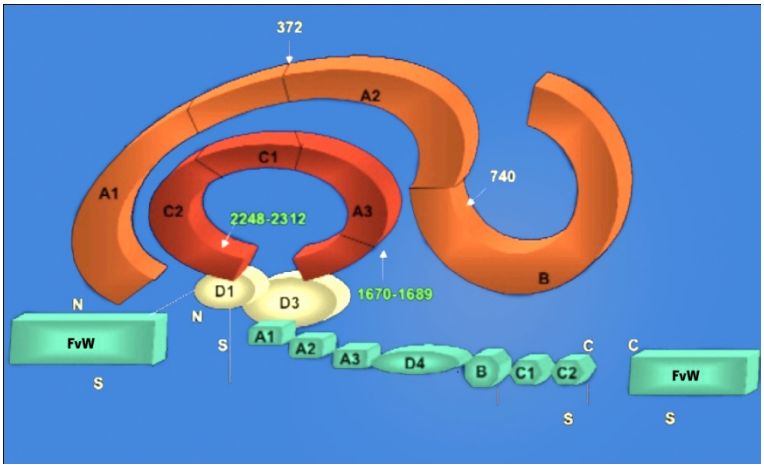

Figura 1.5: Modelo das interacções FVIII/FvW. A ligação do FVIII ao FvW é mediada por dois locais de ligação na cadeia leve do FVIII. O modelo é baseado nas informações disponíveis que indicam que a região acídica perto do domínio A3 e a região do terminal carboxílico no domínio C2 estão fisicamente próximos e formam um local de ligação de elevada afinidade para a região terminal amínica do FvW que contém os domínios D1 e D2. (Retirado e adaptado de [18])

1.2.3.3. Função do Factor VIII no Complexo "Tenase"

A função do FVIIIa no complexo "tenase" manifesta-se através da actividade catalítica do complexo: a actividade proteolítica do FIXa é potenciada pelo FVIII [21]. A formação deste complexo requer uma bicamada lipídica rica em fosfatidilserina (fosfolípido aniónico), FVIIIa, FIXa e iões cálcio [26]. A superfície fosfolipídica aniónica é fornecida pelas plaquetas activadas, nas quais a fosfatidilserina, através de um processo de translocação, passa a fazer parte do folheto externo da membrana. O papel da superfície fosfolipídica é concentrar os componentes do complexo, reduzir as suas interacções de um espaço tri-dimensional para um espaço bi-dimensional e, possivelmente, facilitar o posicionamento de cada componente permitindo a clivagem eficiente do substrato [21, 27, 28]. O FVIII liga-se à membrana plasmática das plaquetas activadas através do domínio C2 [26] e ao FIXa através dos domínios A2 e A3 [29]. O domínio A2 interage directamente com o

domínio catalítico do FIXa e o domínio A3 serve de receptor ao FIXa [26]. O domínio A1 liga o substrato do complexo “tenase”, o FX [26].

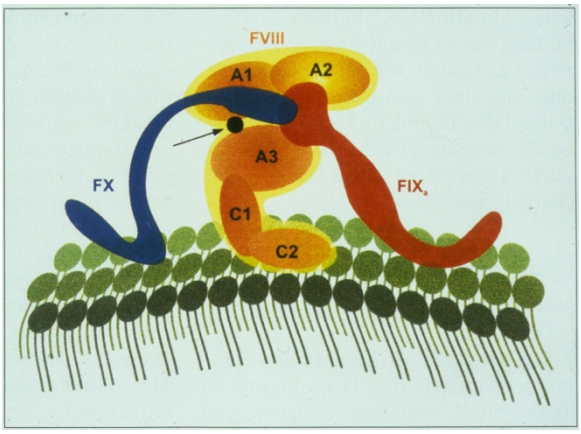

Figura 1.6: Complexo tenase. Retirado de Oldenburg, 2002. [30]

1.2.3.4. Síntese e Secreção do Factor VIII

O FVIII é essencialmente sintetizado no fígado pelos hepatócitos e células endoteliais sinusoidais [31], ocorrendo, em menor quantidade, produção extra-hepática ao nível dos pulmões [32], rins e tecidos linfáticos [21, 31]. É produzido sob a forma de uma cadeia polipeptídica linear com 2351 aminoácidos, dos quais 19 constituem o péptido sinal [25]. Após a síntese o FVIII sofre intenso processamento intracelular no Retículo Endoplasmático (RE) e Aparelho de Golgi (AG), mas não é eficientemente secretado da célula [21, 33]. A fase inicial da secreção envolve a clivagem do péptido sinal e a translocação do polipéptido com 2332 aminoácidos para o lúmen do RE onde ocorre glicosilação de resíduos de asparagina essencialmente ao nível do domínio B. Esta modificação pós-translação é necessária para a correcta conformação da proteína [34] e depende da interacção gradual do FVIII com as proteínas acompanhantes (*chaperones*) calreticulina, calnexina e BiP que regulam a sua secreção e/ou degradação. As moléculas com

conformação aberrante são transportadas para o citoplasma e degradadas e o transporte das moléculas de FVIII com conformação correcta é feito para o AG via vesículas ERGIC especializadas [26]. As proteínas envolvidas no transporte são a MCFD2 e LMAN1 que se ligam a resíduos de manose presentes no domínio B [26]. Imediatamente após a secreção, o FVIII interage com o FvW através dos domínios C1 e C2 e a região acídica *ra3* [27]. Esta associação prolonga a semi-vida do FVIII de 2 horas para 12 horas [26].

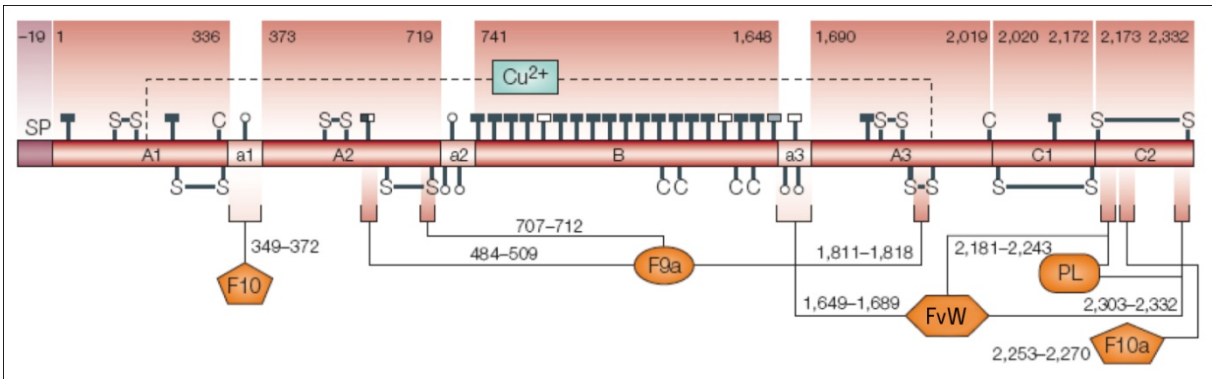

Figura 1.7: Domínios estruturais do FVIII: propriedades e locais de interação do FVIII. (SP: Péptido sinal; PL: fosfolípidos; S-S: pontes dissulfito; C: cisteínas livres necessárias ao *folding* correcto da proteína. Os números indicam as posições dos aminoácidos. Os quadrados pretos, representam locais de glicosilação. Os quadrados brancos, locais não glicosilados. Os quadrados cinzentos, locais potencialmente glicosilados e os quadrados pretos e brancos, resíduos parcialmente glicosilados. (Retirado e adaptado de [35]; dados igualmente obtidos de [21])

1.2.3.5. Activação proteolítica e Inactivação do Factor VIII

Após o início da coagulação e subsequente activação das proteases serínicas, o FVIII é sujeito a alteração das propriedades moleculares, incluindo a dissociação do FvW e desenvolvimento de actividade biológica [21]. A activação do FVIII requer clivagens entre os domínios A1-A2, A2-B e B-A3. A trombina e o FXa são as proteases responsáveis pela sua activação [27, 28].

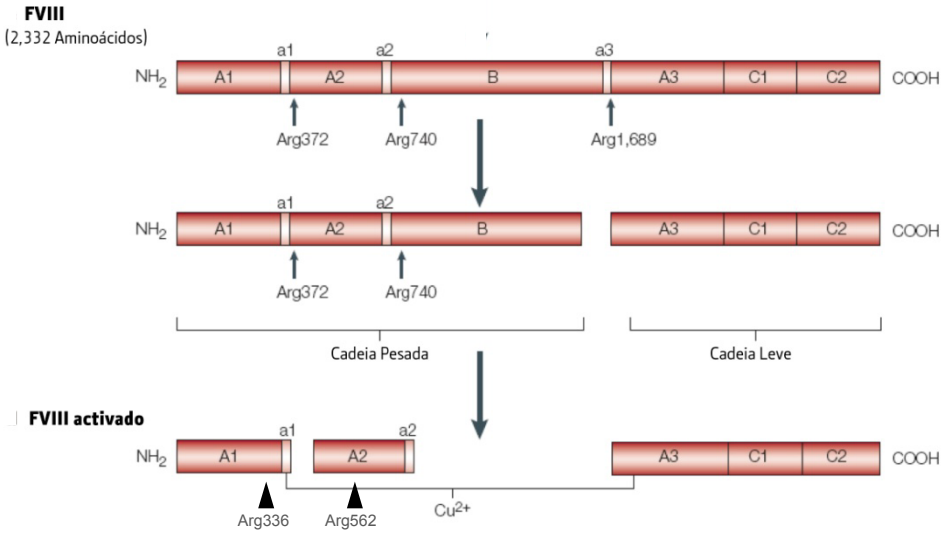

Figura 1.8: Domínios estruturais e processamento do FVIII. Entre os domínios A1 e A2, A2 e B e B e A3 existem 3 regiões ricas em resíduos aminoacídicos de natureza acídica. São mostrados os locais de clivagem pela trombina (Arg1689, Arg740 e Arg 372) e os dois locais de clivagem da proteína C (Arg 336 e Arg 562) para inactivação do FVIIIa. (Retirado e adaptado de Graw, 2005 [35])

A inactivação do FVIII pode ocorrer por dissociação da subunidade A2 [21, 28] ou por degradação proteolítica [21]. O FVIIIa é uma molécula instável que perde rapidamente a sua actividade. Esta instabilidade pode ser atribuída à fraca interacção entre o domínio A2 e o dímero A1/A3-C1-C2 [21]. A taxa de dissociação do domínio A2 é reduzida através do FIXa que estabelece uma ponte entre as duas estruturas [28]. A degradação proteolítica envolve a clivagem da cadeia pesada no resíduo Arg336 pelo FIXa, FXa e PCA (protease serínica capaz de inactivar o FVIIIa ligado à superfície das plaquetas) e a clivagem no resíduo Arg562 apenas pela PCA. A clivagem no resíduo Arg336 no FVIIIa separa a região *ra1* que liga os domínios A1 e A2 e facilita a rápida dissociação do domínio A2 do heterotrímero activado [21]. A clivagem do domínio A2 no resíduo Arg562, destrói a capacidade da subunidade A2 se ligar ao local activo do FIXa, essencial para a actividade do FVIIIa [21, 28].

2. DEFICIÊNCIA CONGÉNITA DE FACTOR VIII

2.1. Hemofilia

O défice ou disfunção do FVIII – Hemofilia A (HA) é a coagulopatia mais comum e mais grave que afecta indivíduos do sexo masculino, com uma prevalência estimada de 1:5 000 nascimentos, [1] e raramente mulheres [2, 3]. Não afecta nenhuma etnia em particular, nem se encontra sujeita a quaisquer limitações geográficas [31, 35-38]. A transmissão é recessiva ligada ao cromossoma X [37] e tem sido mantida na população pelo equilíbrio entre a perda de genes mutados (devido à escassa descendência dos indivíduos afectados) e o aparecimento de novas mutações [1, 39].

A Hemofilia A caracteriza-se por hemorragias de difícil controlo nos casos mais graves que se manifestam nos primeiros anos de vida. A variedade da expressão fenotípica correlaciona-se com o nível de FVIII circulante (FVIII:C) e está classificada como severa, moderada e ligeira, dependendo da quantidade de FVIII residual detectada no plasma [3, 40]. A HA é considerada severa se os níveis de FVIII circulante forem inferiores a 1% (0.01 UI/mL) (≈50% dos casos), moderada entre 1-5% (0.01 – 0.05 UI/mL) e ligeira quando os níveis de FVIII são superiores a 6% (0.06 UI/mL) [40] (Tabela II).

Tabela II: Classificação do grau de severidade na Hemofilia A, de acordo com os critérios da ISTH [40]**.**

Actividade residual de FVIII	Severidade	Aspectos clínicos
<0,01 UI/mL (<1% do normal)	Severa	Hemorragias espontâneas nas articulações e músculos; hemorragias excessivas após cirurgia, extracções dentárias ou traumatismo.
0,01 - 0,05 UI/mL (1% - 5% do normal)	Moderada	Hemorragias nas articulações e músculos após trauma *minor*; hemorragia excessiva após cirurgia, extracções dentárias ou traumatismo.
> 0,05 - < 0,40 UI/mL (>5% - <40% do normal)	Ligeira	Não ocorrem hemorragias espontâneas; hemorragias após cirurgia, extracções dentárias ou traumatismo.

Os locais da hemorragia incluem as articulações (joelho e cotovelo), músculos, sistema nervoso central, superfícies mucosas (nasais e orais), tracto gastrointestinal e genito-urinário, árvore pulmonar e sistema cardiovascular.

2.1.1. Hereditariedade da Hemofilia A

Na grande maioria dos casos a HA é transmitida pelas mulheres portadoras de mutações no gene *F8*. A mutação está presente ao longo de muitas gerações, confinada a um ramo da família ou manifestando-se através de um caso esporádico [1]. Cerca de 33% dos indivíduos com HA têm mutações *de novo* e a hemofilia manifesta-se pela primeira vez na família [37].

Os homens com Hemofilia não transmitem a doença aos filhos, mas todas as filhas serão portadoras (Figura 1.9).

Os níveis de FVIII:C das portadoras podem ser normais ou reduzidos dependendo da variabilidade do mosaicismo das células somáticas em que se encontra activo o cromossoma X com o alelo normal ou com o alelo mutado [26, 41]. Em casos muito raros, mulheres com grande predominância de clones celulares com o cromossoma X com o alelo mutado podem ter níveis mais baixos de FVIII e ser sintomáticas. Pelo contrário, se o cromossoma X com o alelo normal for predominante, as mulheres podem ter doseamentos de FVIII:C normais. Esta é a razão principal para que a determinação da actividade do FVIII:C não seja fiável no diagnóstico de portadoras de Hemofilia A.

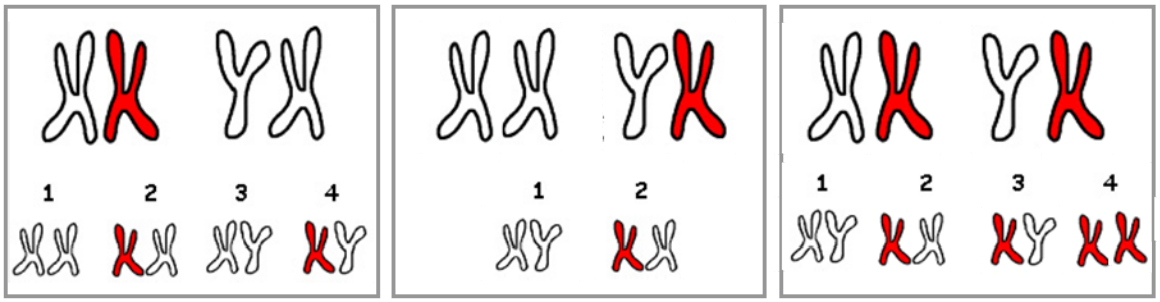

Figura 1.9: Transmissão ligada ao cromossoma X. Probabilidades de genótipo. (Retirado e adaptado de http://www.hemofilia.bayer.es)

2.1.2. Gene do Factor VIII: Estrutura e localização

O gene do FVIII está localizado no braço longo do cromossoma X, perto da banda q28. Tem 186 Kb de extensão e contém 26 exões que codificam uma proteína com 2351 aminoácidos, incluindo o péptido sinal (19 aminoácidos) [1, 25, 42]. O tamanho dos exões varia de 69 a 262 nucleótidos, exceptuando o exão 14 que tem 3106 nucleótidos e o exão 26 com 1953 nucleótidos. Tem 6 intrões com tamanho superior a 14 Kb, destacando-se o intrão 22 (IVS22), com aproximadamente 32 Kb de extensão [20]. O ARNm do FVIII normal tem 9 Kb com uma sequência codificante composta por 7053 nucleótidos [20, 25, 42].

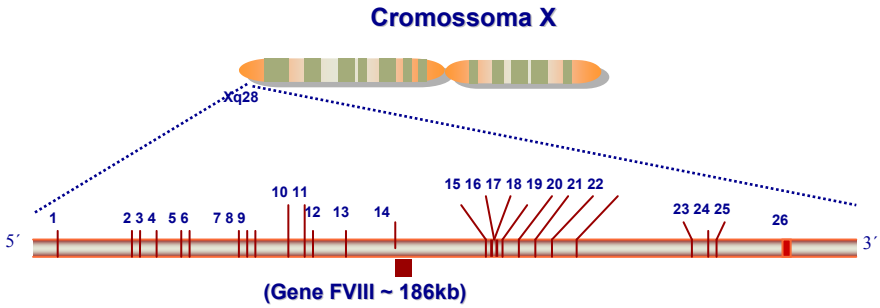

Figura 1.10: Localização e estrutura do gene do FVIII. (Retirado e adaptado de Gallardo *et al.*, 2001 [43])

2.1.3. Mutações no gene do Factor VIII

A heterogeneidade clínica e bioquímica da HA é justificada pela grande variedade de mutações no gene do FVIII (*F8*). Esta diversidade de mutações pode ser constactada na base de dados internacional: HAMSTeRS – *The Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site* (http://europium.csc.mrc.ac.uk) [39] onde se encontram registadas todas as mutações identificadas (Tabela III).

Tabela III: Perfil Mutacional na Hemofilia A.
Dados retirados do HAMSTeRS (http://europium.csc.mrc.ac.uk) à data de 2007.

Tipo de mutação	Número absoluto	Valor relativo (%)	Fenótipo
Inversão do Intrão 22	*	50	
Inversão do Intrão 1	*	5	
Mutações *nonsense*	237		
Pequenas delecções/inserções	139/114		**Fenótipo Severo**
Grandes delecções	131		
Grandes inserções	2		
Mutações de *splicing*	53		
Mutações *missense*	1339		**Fenótipo Severo e Não Severo**
Pequenas delecções	6		
Mutações de *splicing*	40		

* Dados não disponíveis no site HAMSTeRS

Cerca de metade dos casos de HA severa são devidos a inversões recorrentes no gene do FVIII (inversão do intrão 22 e inversão do intrão 1) que resultam da recombinação entre regiões homólogas [20].

No caso da inversão do intrão 22 (IVS22) há homologia entre uma região de 9.5 Kb no intrão 22 (*int22h-1*) e duas cópias extragénicas homólogas (*int22h-2* e *int22h-3*) [44, 45]. O interior do intrão 22 contém 2 genes adicionais: *F8*A e *F8*B. Freije and Schlessinger (1992) demonstraram a existência de 3 cópias do gene *F8*A e suas regiões adjacentes, uma no intrão 22 e outras duas na extremidade

telomérica a jusante do local de início de transcrição do gene do FVIII [46]. O gene *F8*A não possui intrões, o seu sentido de transcrição é contrário ao do gene do FVIII e tem 2 cópias adicionais cerca de 500 Kb a jusante do gene do FVIII. O intrão 22 do gene do FVIII é muito extenso (32Kb) e contém uma região com CpG a cerca de 10 Kb do exão 22. O gene *F8*B também está localizado no intrão 22 do gene do FVIII e é transcrito no sentido contrário ao do gene do FVIII. Os genes *F8*A e *F8*B são expressos de forma ubíqua [45].

Na inversão do intrão 22 (IVS22) podem ocorrer dois tipos de recombinação que originam dois tipos de inversão: proximal (80%) ou distal (20%). Este tipo de rearranjo tem origem quase exclusivamente nas células germinais masculinas, geralmente nas do avô materno, confirmando a hipótese que o emparelhamento do braço longo do cromossoma X na meiose feminina inibiria o processo de emparelhamento intracromossómico que daria lugar à inversão [47, 48].

No caso da inversão do intrão 1 o mecanismo de recombinação é em tudo semelhante à inversão do intrão 22. A homologia existe entre duas regiões de 1491 pares de bases: uma no interior do intrão 1 e outra extragénica [49].

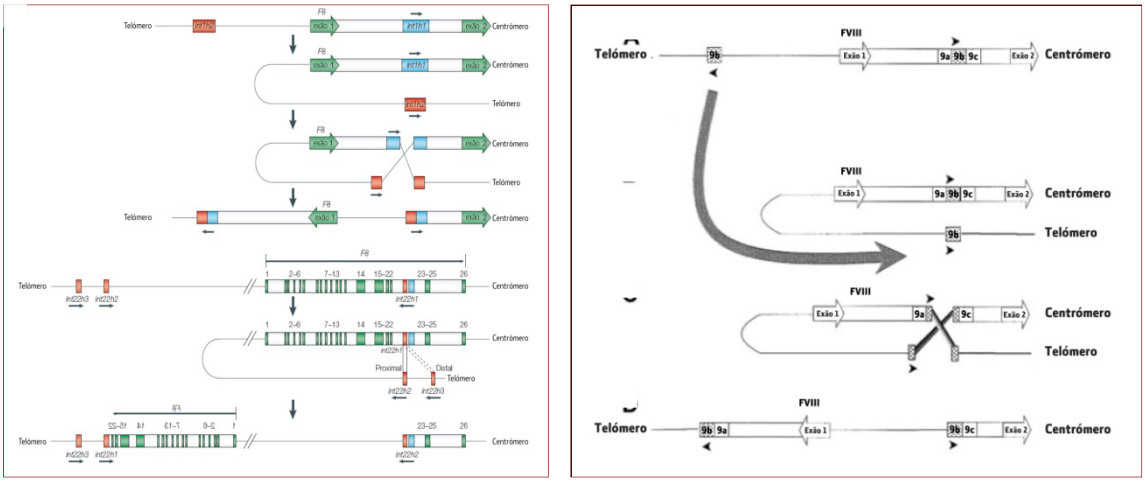

Figura 1.11: Representação esquemática do mecanismo de Inversão do Intrão 22 e Intrão 1 do gene *F8*. (Retirado e adaptado de Graw, 2005 e Bagnall, 2002 [35, 49])

As mutações *nonsense* compreendem cerca de 20% do total das mutações pontuais. Existe também um pequeno número de grandes delecções, inserções de retrotransposões, duplicações e rearranjos cromossómicos que envolvem quebras do gene do FVIII. Cerca de um terço das pequenas delecções e metade das inserções foram encontradas no exão 14.

As mutações que ocasionam ausência de produção de proteína ou produção de proteínas truncadas (codões de terminação prematura, delecções, inserções e anomalias de *splicing*) estão associadas com deficiências graves do factor FVIII e fenótipo severo [50]. Há algumas deficiências severas associadas a mutações *missense*, em que o *folding* incorrecto da proteína mutada altera a sua conformação e a torna instável a nível intra e extracelular, o que se traduz numa deficiência grave de factor no plasma [50].

2.1.4. Estudo de portadoras e Diagnóstico Prénatal

Nos últimos 20 anos, com o desenvolvimento das metodologias de Biologia Molecular, o diagnóstico prénatal (DPN) foi-se tornando cada vez mais viável.

O DPN inicialmente executado por biópsia das vilosidades coriónicas, é actualmente realizado em líquido amniótico, sangue fetal ou por diagnóstico pré-implantatório.

Após identificação da mutação num doente com Hemofilia A, a avaliação da árvore genealógica é a primeira abordagem no estudo familiar. No entanto, é importante estabelecer que a mutação identificada é responsável pelo fenótipo observado no indivíduo afectado e determinar o estado de heterozigotia de uma provável portadora antes de proceder ao diagnóstico prénatal [51]. A metodologia de

PCR e sequenciação nucleotídica directa é simples, de elevada sensibilidade permitindo o diagnóstico prénatal em tempo útil.

2.1.5. Genes moduladores do fenótipo Hemofilia A

A severidade das manifestações clínicas nos indivíduos com Hemofilia A depende do tipo de mutação no gene *F8* que condiciona os níveis de actividade do FVIII. Surpreendentemente, alguns indivíduos com doseamentos da actividade de FVIII <1% têm uma clínica hemorrágica moderada [35, 52], o que faz supôr da existência de factores moduladores do fenótipo.

A mutação Factor V Leiden (FV Leiden) e a variante da Protrombina G20210A (PRT G20210A) são mutações de ganho de função [53] que causam, respectivamente, uma deficiente inactivação do Factor V activado (FVa) e um aumento dos níveis plasmáticos de Protrombina, favorecendo a hipercoagulabilidade. A co-herança das mutações FV Leiden e/ou da variante da Protrombina G20210A pode ser um factor determinante na atenuação do fenótipo da hemofilia A severa [52].

2.1.6. Inibidores específicos para o Factor VIII

Nos indivíduos com Hemofilia A severa cerca de 30% desenvolvem uma resposta imunológica à terapia de substituição com concentrados de FVIII [54, 55]. O desenvolvimento de autoanticorpos para FVIII nos HA é raro [51].

O maior risco que advém do desenvolvimento de inibidores está associado a mutações *nonsense*, grandes delecções e recombinações intracromossómicas (inversões) no gene do FVIII, mutações estas que originam ausência completa de FVIII endógeno [56]. Os indivíduos com este tipo de mutações estão sujeitos a tratamento com maior frequência devido ao grande número de episódios

hemorrágicos, associação com inflamação e danos tecidulares. Contudo, a presença de inibidores também está associada a mutações que afectam determinados domínios do FVIII (Tabela IV) [57, 58]. Determinados anticorpos apenas reconhecem o FVIII quando ligado ao FvW devido à alteração da estrutura tridimensional [18]. De facto, os anticorpos competem com o FvW pela ligação aos domínios A3 e C2 do FVIII (epítopos das céluas B) e com o maior epítopo das células T que se localiza no interior dos domínios C1/C2 [18, 58].

Tabela IV. Prevalência de inibidores específicos para o Factor VIII em doentes com Hemofilia A relativamente ao tipo de mutação [59].

Prevalência (%)	*Tipo e Localização da Mutação*
68	Delecção de um ou mais exões
50	Mutações *nonsense* na cadeia leve do FVIII
34	Inversão do intrão 22
21	Inserções e delecções fora de sequências contínuas de Adeninas
14	Mutações *nonsense* na cadeia pesada do FVIII
12	Mutação *missense* na cadeia leve do FVIII
12	Delecção de um exão
6	Inserções e delecções em sequências contínuas de Adeninas
4	Mutações *missense* na cadeia pesada do FVIII
2	Mutações de *splicing*

3.OBJECTIVOS DO TRABALHO

Identificar as alterações moleculares no gene *F8* responsáveis pelo fenótipo de Hemofilia A nos doentes seguidos, e referidos, no Centro de Hemofilia do Centro Hospitalar de Coimbra, E.P.E., e estabelecer a metodologia para identificação de portadoras e diagnóstico prénatal.

Objectivos Gerais:

- Implementar e optimizar novas metodologias de identificação de mutações no gene *F8* de modo a estabelecer uma estratégia de investigação mais eficaz.
- Identificar as mutações no gene *F8* em 141 doentes com Hemofilia A.

Objectivos Específicos:

- Estabelecer a relação genótipo/fenótipo neste grupo de doentes e identificar factores moduladores do fenótipo dos Hemofílicos severos.
- Com base nos dados obtidos rever o algoritmo de investigação de doentes e portadoras.

Capítulo II

MATERIAL E MÉTODOS

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. POPULAÇÃO ESTUDADA

O Centro de Hemofilia do Centro Hospitalar de Coimbra (CHC), E.P.E. é o local de estudo de Hemofilia A na região Centro, onde são seguidos os doentes com Hemofilia A, B e outras coagulopatias congénitas - tratamento substitutivo, hospital de dia e internamento; consultas de *follow-up* regulares e, quando necessário, nas várias especialidades envolvidas.

Integra o Laboratório de Hemostase e de Biologia Molecular onde é feito o diagnóstico e caracterização dos doentes, a identificação de portadores e a monitorização da terapêutica.

Sempre que indicado, são efectuados os estudos familiares para identificação de portadores e aconselhamento genético. Os diagnósticos prenatais são feitos em colaboração com a Unidade de Diagnóstico Prénatal (DPN) da Maternidade Bissaya Barreto e outros Centros de DPN.

O Centro de Hemofilia do CHC, E.P.E. tem protocolos de colaboração com os hospitais:

- Hospital do Divino Espírito Santo - Ponta Delgada, Açores
- Hospital Mindelo - Cabo Verde (*Hemophilia Medical Centre Twining* WFH)

Este estudo foi efectuado num grupo de 141 doentes com HA pertencentes a 103 famílias aparentemente não relacionadas. Antes do início do estudo foi obtido o consentimento informado. Noventa e nove dos doentes (64 famílias) são seguidos no Centro de Hemofilia do Centro Hospitalar de Coimbra, E.P.E.; 42 doentes (39

famílias) são seguidos noutras Instituições e apenas recebemos amostras de sangue periférico, acompanhadas da informação clínica.

A classificação da severidade da HA foi efectuada de acordo com os critérios da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostase (ISTH) [40]: 67 hemofílicos severos, 9 moderados e 65 ligeiros. Dos 67 indivíduos com HA severa, 43, são seguidos regularmente no Centro de Hemofilia do CHC. Neste grupo foi recolhida a informação detalhada relativa ao fenótipo clínico, idade do primeiro episódio hemorrágico, frequência do tratamento substitutivo e desenvolvimento de inibidores.

Das 103 famílias estudadas, 96 são de origem portuguesa: 87 de Portugal Continental e 9 dos Açores; 6 famílias são de origem Cabo Verdeana e 1 de origem Romena (Tabela V).

Tabela V: Distribuição geográfica e fenótipo dos doentes estudados.

Grau de severidade	Portugal n=121	Açores n=14	Cabo Verde n=5	Roménia n=1	Doentes Total n=141	Famílias Total n=103
HA severa	53	8	5	1	67	52
HA moderada	7	2			9	7
HA ligeira	61	4			65	44

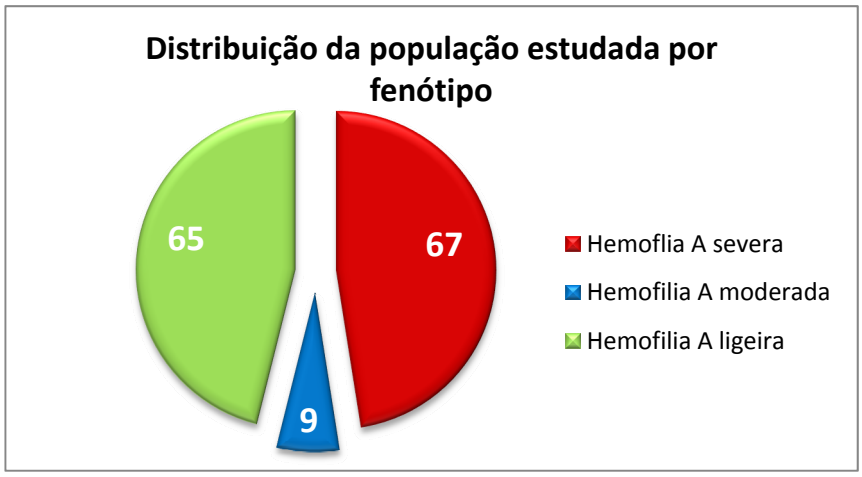

Figura 2.1: Distribuição da população estudada por fenótipo.

2. COLHEITA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Para a realização dos estudos funcionais e imunológicos foram utilizadas amostras de sangue colhidas por punção venosa atraumática em tubos de vácuo de 3 mL (Vacuette, Greiner bio-one, Germany) e anticoaguladas com citrato de sódio (9:1 v/v, com citrato trissódico 0,129M pH 7,4). As amostras obtidas foram centrifugadas a 1200-1500*g* durante 15 minutos para obter plasma pobre em plaquetas para processamento. No plasma obtido foram realizados de imediato os estudos funcionais em paralelo com controlos de nível patológico e normal. O restante plasma foi separado em alíquotas e congelado a –80º C até à realização dos estudos imunológicos.

Os estudos moleculares foram realizados em amostras de sangue total obtidas igualmente por punção venosa atraumática, mas anticoaguladas com K_3EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético tripotássico: 1.5 ± 0.15 mg/mL sangue) [55, 60] e congeladas a -80ºC até se proceder ao isolamento de ADN.

Os estudos para DPN foram efectuados a partir de líquido amniótico obtido por aminiocentese às 12-15 semanas de gestação. Simultaneamente, e em colaboração com Centro de Diagnóstico Prénatal da Faculdade de Medicina da Universidadede Coimbra, é efectuada a cultura celular de amniócitos. No ADN obtido do líquido amniótico é sempre executado o despiste de contaminação feto-materna através dos marcadores TH0/TH01, FES/FPS, VWA e F13/A01 [61].

As amostras referidas ao Laboratório de Hemostase vindas de outros Centros têm que cumprir os requisitos de colheita e separação de amostra referidos (quando necessário) e serem recepcionadas em boas condições. Todas as amostras têm que ser acompanhadas de uma breve história clínica (http://www.chc-hematologia.org).

3. MÉTODOS

3.1. Estudos Funcionais e Imunológicos

3.1.1. Testes de rastreio

3.1.1.1.Determinação do Tempo de Tromboplastina Parcial Activada

O TTPA é um teste de coagulação *in vitro* que mede o tempo que uma amostra de plasma demora a produzir um coágulo, após adição de um agente activador, usando sistemas ópticos e mecânicos de detecção. Permite o rastreio *in vitro* de anomalias nas reacções de coagulação sanguínea desencadeadas por exposição do plasma a superfícies carregadas negativamente (activadores). O plasma é incubado por 3 minutos com um reagente (cefalina) que fornece fosfolípidos procoagulantes e um pó superficialmente activo (p. ex.: sílica micronizada). É adicionado cálcio 0,025M e o tempo de formação do coágulo é registado.

3.1.2. Testes confirmatórios

3.1.2.1. Doseamento de FVIII por Método Coagulante

O doseamento de FVIII é baseado no TTPA e mede a actividade do factor em causa na produção do coágulo de fibrina. O método baseia-se na capacidade de o plasma em estudo, quando incubado com plasma liofilizado deficiente na proteína que se pretende quantificar, mas contendo todos os outros factores necessários para assegurar uma coagulação normal, corrigir os tempos de coagulação prolongados.

A determinação da actividade do FVIII nas amostras em estudo foi realizada através da utilização de plasma deficiente em FVIII (Plasma deficiente em FVIII, Dade Behring, Germany), hidratado de acordo com as instruções do fabricante.

Quando o valor obtido no doseamento de FVIII for inferior a 15% dever-se-á proceder à reavaliação utilizando um procedimento próprio - doseamento FVIII valores baixos. Este procedimento tem características próprias: utiliza uma curva de calibração para valores baixos onde as diluições do Plasma Humano Padrão são efectuadas em plasma deficiente no factor que se pretende avaliar.

As amostras foram processadas a par com um plasma controlo (HemosIL Normal Control, IL, USA e Plasma de Control N, Dade Behring, Germany), nos sistemas automáticos ACL9000 (IL), Sysmex CA-1500 e BCS XP - Siemens®, Germany.

3.1.2.2. Doseamento de FVIII por substratos cromogénicos

O ensaio cromogénico para determinação da actividade de FVIII é mais vantajoso que o método coagulante, uma vez que não é sensível à pré-activação do FVIII, evitando assim a sobrevalorização da sua actividade.

Neste ensaio, o FVIII presente na amostra a estudar é completa e rapidamente activado pela trombina contida no reagente. O FVIIIa acelera a conversão de FX a FXa na presença de FIXa, fosfolípidos (PL) e iões cálcio. A actividade do FXa é avaliada pela hidrólise de um substrato cromogénico específico, a *p*-nitroanilida (S-2765) (Figura 2.2). O desenvolvimento de cor por libertação do cromóforo *p*-nitroanilina (pNA) é medido espectrofotometricamente a 405 nm e a sua intensidade é proporcional à actividade de FXa, ou seja, à actividade de FVIII na amostra.

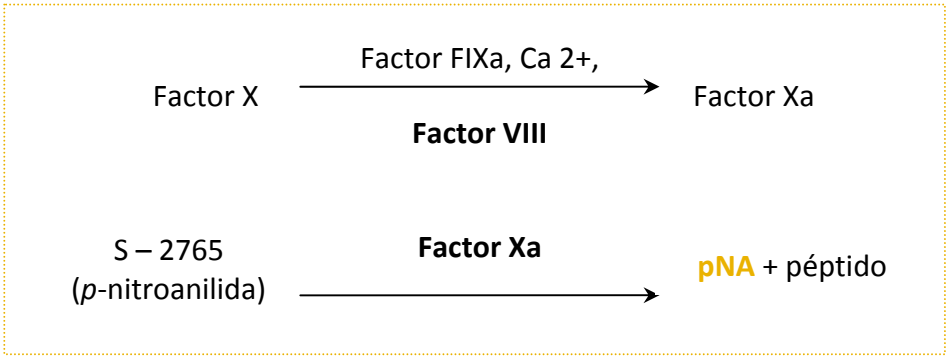

Figura 2.2: Representação esquemática das reacções que ocorrem na determinação da actividade de FVIII por substratos cromogénicos.

Este método é usado em paralelo com o método coagulante e preferencialmente, para monitorizar a terapêutica substitutiva com concentrado de FVIII (Factor VIII cromogénico, Dade Behring, Germany) realizado num sistema óptico automático (Sysmex CA-1500 e BCS XP - Siemens®, Germany).

3.1.2.3. Doseamento de Factor de von Willebrand antigénico e determinação da actividade do Factor de von Willebrand

O doseamento de FvW:Ag e a determinação da FvW:Act foram efectuados com *kits* comerciais de imunoensaio enzimático (DG- Diagnostic Grifols-EIA vWF) baseados na técnica de ELISA, num sistema automático de ELISA (Triturus, Grifols).

Na determinação de FvW:Ag, o suporte sólido (placa de micro-ELISA), encontra-se revestido com um anticorpo anti-FvW humano monoclonal específico capaz de ligar o FvW da amostra ou do controlo; na determinação do FvW:Act, o revestimento é com o anticorpo monoclonal específico para região funcional do FvW (ligação à Glicoproteína Ibα). O complexo FvW - anticorpo monoclonal é revelado através da utilização de um segundo anticorpo marcado com peroxidase que se liga a um determinante antigénico diferente na molécula de FvW. A actividade

enzimática é demonstrada pela sua acção oxidativa sobre o substrato tetrametilbenzidina (TMB) na presença de peroxidase de ureia. A reacção é terminada com a adição de ácido sulfúrico na concentração de 0,36N e a intensidade de cor obtida é lida no comprimento de onda de 450 nm contra um filtro de referência 650 nm.

3.1.2.4. Doseamento de FVIII antigénico

Na HA, a quantidade de FVIII procoagulante (FVIII:C) detectada pode ser comparada com os níveis plasmáticos de antigénio [FVIII:Ag, material de reacção cruzada (CRM)]. Isto permite distinguir o fenótipo CRM negativo (ausência total de FVIII no plasma), o CRM positivo (presença de FVIII disfuncional no plasma) e o CRM reduzido, quando os níveis plasmáticos de FVIII são reduzidos [15, 26].

O doseamento de FVIII antigénico (FVIIIC:Ag) foi efectuado com um *kit* comercial de imunoensaio enzimático (Asserachrom® VIIIC:Ag, Diagnostica Stago, France) baseado na técnica de ELISA, num sistema automático de ELISA (Triturus, Grifols).

O suporte sólido (placa de micro-ELISA), encontra-se revestido com um anticorpo monoclonal específico de rato (F(ab')2 de MoAbs 833), capaz de ligar o FVIII da amostra ou do controlo. O FVIII:Ag que se liga a esse anticorpo monoclonal é revelado através da utilização de um segundo anticorpo marcado com peroxidase (MoAbs D4H1), que se liga a outro determinante antigénico na molécula de FVIII. A actividade enzimática é demonstrada pela sua acção oxidativa sobre o substrato tetrametilbenzidina (TMB) na presença de peroxidase de ureia. A reacção é terminada com a adição de ácido sulfúrico na concentração de 1M e a intensidade de cor obtida é lida no comprimento de onda de 450 nm.

3.1.2.5. Pesquisa de Inibidores e Doseamento de inibidores pelo método Bethesda/Nijmegen

O desenvolvimento de inibidores específicos contra o FVIII é uma complicação do tratamento de indivíduos com Hemofilia A. A presença ou ausência destes inibidores foi determinada, inicialmente através de um teste de pesquisa que se baseia na mistura, em partes iguais (1:1), de plasma do indivíduo e plasma normal. A adição de plasma normal irá "corrigir" a deficiência e normalizar o TTPA na mistura. A não correcção indica a presença de inibidores. Os inibidores anti-FVIII necessitam de incubação durante 2 horas a 37ºC – inibidores de acção lenta/ dependentes do tempo e da temperatura, pelo que se efectua a leitura imediata e após incubação [55].

A titulação do inibidor foi determinada pelo método Bethesda e Bethesda/Nijmegen [55, 60, 62]. Em ambos os métodos, a unidade Bethesda (UB) é definida como a quantidade de inibidor capaz de neutralizar 50% de FVIII:C no plasma normal após incubação de 2 horas a 37ºC. Após o período de incubação, o FVIII residual é determinado e a quantidade de inibidor calculada a partir de um gráfico *standard* da actividade do FVIII residual *versus* unidade de inibidor. O método Nijmegen-Bethesda modificado é usado para monitorizar o desenvolvimento de inibidores para o FVIII plasmático com baixo título e reduzir a possibilidade de obter falsos positivos.

3.2. Estudos Moleculares

3.2.1. Extracção de ADN pelo método de *salting-out*

O ADN genómico foi obtido a partir de sangue periférico anticoagulado em K_3EDTA, segundo o método *salting-out* modificado [63]. O sangue, previamente congelado, foi homogeneizado em vortex (TechnoKartell, Iberlab) e 700 µL de sangue total foram colocados em alíquotas de 1,5 mL previamente marcadas, juntamente com 700 µL de tampão de lise (0,32M Sacarose, Sigma; 10mM Tris-HCl pH7.5, 5mM $MgCl_2.6H_2O$, 1% Triton X-100). A suspensão celular foi submetida a agitação vigorosa em vortex durante 30 segundos e, posteriormente, sujeita a centrifugação (Beckman GP Centrifuge) durante 1 minuto a 13 000 rotações por minuto (r.p.m.). O sobrenadante foi aspirado por meio de pipeta de *Pasteur* e foram adicionados novamente 700 µL de sangue total e igual proporção de tampão de lise. O sedimento obtido (fase nuclear) foi ressuspendido em 1 mL de água destilada, agitado vigorosamente até desfazer o sedimento e centrifugado durante 1 minuto a 13 000 r.p.m.. Este procedimento foi repetido até o sedimento se apresentar de cor branca. Foi preparada uma solução desnaturante com água destilada, 5x tampão Proteinase K (0,375M NaCl, 0,12M EDTA), 20% SDS e Proteinase K (10 mg/mL), da qual foram retirados 370 µL para adicionar ao sedimento obtido. A solução foi sujeita a vortex intenso durante 15 segundos e incubada em banho-maria (Watterm DG-22, Diagnostic Grifols) a 60ºC durante 45 minutos, com agitação em vortex a cada 15 minutos. O detergente (SDS) é um detergente aniónico que promove a lise da maior parte das células, desnatura algumas proteínas e inibe a actividade enzimática, dissolve lípidos e ajuda a romper a membrana plasmática e o invólucro nuclear. Juntamente com a PK (protease serínica não específica utilizada para purificar soluções de proteínas contaminantes por clivagem de ligações peptídicas e capaz

de inactivar outras actividades enzimáticas). A enzima (isolada do fungo *Tritirachium album*) ajuda a degradar proteínas à temperatura óptima do seu funcionamento, temperatura essa que sendo elevada (60º C) inactiva as ADNases responsáveis pela degradação do ADN e auxilia a dissolução das estruturas membranares. Após a incubação, foram adicionados à solução 100 µL de NaCl 6M, agitado durante 15 segundo e centrifugado durante 7 minutos a 13 000 r.p.m.. Desta solução foram retirados 450 µL do sobrenadante e transferidos para nova alíquota devidamente identificada. A este volume foi adicionado 1 mL de etanol absoluto gelado (-20ºC) e a solução obtida foi invertida suavemente até ser visualizada a "medusa" de ADN. A alíquota foi mantida a -40ºC durante 3 a 4 horas e depois centrifugada durante 5 minutos a 13 000 r.p.m.. O etanol foi retirado por meio de uma pipeta de *Pasteur* sem que o ADN fosse tocado. O etanol sobejante foi evaporado em centrifuga de vácuo (Eppendorf Concentrator 5301, Alfagene). O ADN foi dissolvido em 300 µL de água destilada e conservado a 4ºC até ser processado.

O sal (NaCl) é utilizado para auxiliar na dissociação das proteínas dos ácidos nucléicos. O álcool possibilita a precipitação dos ácidos nucléicos uma vez que bloqueia a electronegatividade do esqueleto fosfato-açucar e favorece a aglomeração das moléculas de ADN. Como o ADN não é solúvel em álcool, precipita nesta fase. Todos os restantes componentes que dela fazem parte, à excepção do ADN, permanecem em solução.

3.2.2. Extracção de ADN por *kit* comercial (Jetquick, Genomed, GmbH)

Algumas das técnicas de Biologia Molecular requerem ADN de elevada pureza. A quantidade, pureza e integridade do ácido nucleico extraído depende de muitos factores e tem uma grande influência no resultado das técnicas que serão aplicadas, especialmente em alguns tipos de PCR. O método de extracção por *salting-out*, embora permita a obtenção de ADN de qualidade e em quantidade, não o permite com elevada pureza, deixando substâncias que poderão funcionar como interferentes para a realização de PCR, inibindo a *Taq* polimerase.

A extracção de ADN genómico foi realizada seguindo as instruções do fabricante. O ADN genómico foi obtido a partir de 200 μL de sangue total previamente descongelado, aos quais foram adicionados 20 μL de Genomed Protease (20 mg/mL) e 200 μL de tampão K1 do *kit* de extracção. A solução foi vigorosamente homogeneizada no vortex e colocada num banho-maria (Watterm DG-22, Diagnostic Grifols) a 58ºC, durante 10 minutos. No final do período de incubação, foram adicionados 200 μL de etanol absoluto e a solução foi vigorosamente homogeneizada no vortex, de forma a evitar a precipitação dos ácidos nucleicos devido à elevada concentração de álcool. Procedeu-se à identificação de um tubo de recolha, ao qual se juntou uma coluna com membrana de sílica. A solução foi transferida para a coluna de extracção com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur* e centrifugada a 10 600 r.p.m. durante 1 minuto. O líquido existente no tubo de recolha foi eliminado e a coluna, novamente colocada no tubo de recolha. À coluna foram adicionados 500 μL de tampão KX do *kit* comercial e centrifugou-se a 10 600 r.p.m. durante 1 minuto. O líquido do tubo de recolha foi novamente rejeitado e a coluna introduzida no tubo de recolha. Adicionaram-se à coluna 500 μL de tampão K2 do *kit* comercial e centrifugou-se a 10 600 r.p.m

durante 1 minuto. O líquido obtido foi rejeitado e a coluna novamente introduzida no tubo de recolha. A coluna foi centrifugada a 13 000 r.p.m. para remover os restos de tampão da membrana de sílica. A coluna foi transferida para uma alíquota esterilizada previamente identificada. A eluição do ADN foi efectuada com 100 μL de água destilada desionizada adicionados à membrana. A coluna incubou durante 5 minutos à temperatura ambiente e foi centrifugada a 13 000 r.p.m. durante 2 minutos, para recolher o eluado.

3.2.3. Extracção de ADN genómico de líquido amniótico por *kit* comercial (Jetquick, Genomed, GmbH)

O ADN fetal foi extraído a partir de 3 mL líquido amniótico obtido por amniocentese às 12-15 semanas de gestação.

Procedeu-se à homogeneização da amostra de líquido amniótico no vortex, durante 15 a 30 segundos. Numa alíquota esterilizada previamente identificada foi colocado 1 mL de líquido amniótico. A amostra foi centrifugada a 13 000 r.p.m. durante 1 minuto. O sobrenadante foi rejeitado. Adicionou-se mais 1 mL de amostra à alíquota e centrifugou-se a 13 000 r.p.m. durante 1 minuto. O sobrenadante foi rejeitado e foi adicionado 1 mL de soro fisiológico esterilizado para proceder à lavagem das células. A amostra foi centrifugada a 13 000 r.p.m. durante 1 minuto. Após rejeição do sobrenadante, o procedimento utilizado foi o referido no ponto anterior. A eluição do ADN fetal foi efectuada com 25 μL de água destilada desionizada.

3.2.4. Extracção de ARNm por *kit* comercial (RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen)

A extracção e purificação do ARNm foi realizada a partir de 6 mL de sangue total anticoagulado em K_3EDTA, após separação da fraccção linfócitaria de sangue por gradiente de Ficoll® (Lymphoprep™, Axis-Shield, Norway).

Utilizando uma pipeta de *Pasteur*, foi colocada a amostra em tubo de extracção 15 mL, sem perturbar a camada superior de Lymphoprep™. Centrifugou-se a amostra a 3000 r.p.m. durante 30 minutos. Após centrifugação, e sem perturbar as camadas formadas, foi recolhida a camada de células mononucleares para um terceiro tubo de extracção, previamente identificado. De seguida, procedeu-se à lise dos eritrócitos remanescentes com tampão de lise de glóbulos vermelhos (RCLB) 1x (Amersham) refrigerado, para evitar contaminação da hemoglobina na reacção de transcrição reversa. O sedimento obtido foi homogeneizado com pipeta de *Pasteur* e a ele adicionados 10 – 14 mL de tampão fosfato (PBS 1x). A preparação foi sujeita a centrifugação a 3000 r.p.m. durante 4 minutos. O tampão fosfato foi eliminado por inversão do tubo de extracção. Foi então preparado o lisado de Tiocianato de guanidina (GTC): 1 mL da solução de GTC activada com ß-Mercaptoetanol na proporção de 7,1 µL por mL de solução de GTC, e adicionado à amostra. Sujeitou-se a suspensão a vortex vigoroso. Procedeu-se à sua homogeneização passando-a repetidas vezes por agulha de 18G com seringa de 2 mL. Este procedimento permite a degradação de ADN de elevado peso molecular, melhorando o rendimento da extração de ARN. Os lisados foram conservados a – 80ºC até ao momento de extracção de ARNm.

A extração de ARNm foi realizada a partir de 500 µL de lisado celular descongelado. A amostra foi novamente homogeneizada e foram transferidos 500 µL do lisado para uma coluna *gDNA Eliminator*, sujeita a centrifugação a 10 000

r.p.m. durante 30 segundos. Este passo é repetido as vezes necessárias até esgotar todo o volume de lisado na coluna. Ao eluado foram adicionados 500 µL de etanol a 70% (v/v) e procedeu-se a homogeneização. Foram transferidos 700 µL da solução para uma coluna *RNeasy mini spin column* e incubados 30 minutos à temperatura ambiente. Procedeu-se a centrifugação a 10 000 r.p.m. durante 15 segundos. Ao ARN total ligado à membrana da coluna foram adicionados 700 µL de tampão RW1. Procedeu-se a nova centrifugação, nas mesmas condições. Adicionaram-se 500 µL de tampão RPE à coluna e seguiu-se nova centrifugação. Este passo de lavagem foi repetido uma segunda vez. A coluna é então aberta e incubada à temperatura ambiente durante 20 minutos, para permitir a eliminação de restos de etanol.

O ARN obtido é eluído com 25 µL de água livre de ARNases após centrifugação a 13 000 r.p.m. durante 1 minuto.

3.2.5. Determinação Espectrofotométrica da Quantidade de ADN

O método mais utilizado para determinar a quantidade e pureza do ADN genómico é a análise espectrofotométrica. As bases nitrogenadas da dupla hélice apresentam uma absorção máxima no comprimento de onda de 260 nm. A relação entre a concentração de ADN e a absorvância a 260 nm (A_{260nm}) é linear até ao valor de 2,0. Logo, a concentração de ADN em solução pode ser determinada. Por exemplo, ADN de cadeia dupla A_{260nm}=1,0 corresponde a 50 µg/mL. Foram preparadas diluições de 1/200 ou 1/100 de ADN em 1 mL de água destilada e quantificadas a um comprimento de onda de 260nm. A presença de proteínas, ARN, detergentes e solventes orgânicos na preparação pode interferir na determinação. Uma vez que o máximo de absorção do ADN e proteínas ocorrem respectivamente a A260nm e A280nm. Uma preparação de ADN razoavelmente pura deve apresentar

A260nm /A280nm ≥ 1,95. A concentração é determinada em ng/μL. A quantificação do ADN genómico obtida foi realizada no sistema *Thermo Scientific NanoDrop 2000* (Thermo Fisher Scientific).

3.2.6. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Convencional

A PCR é um método in vitro para a síntese enzimática de determinadas sequências de ADN. A técnica de PCR é caracterizada pela multiplicação (amplificação) de ADN durante um determinado número de ciclos repetitivos. Cada ciclo compreende 3 fases dependentes da temperatura: desnaturação, fusão e extensão.

A temperatura de fusão é a mais importante, pois pode afectar a especificidade da reacção. Como a hibridização ADN – ADN é um fenómeno dependente da temperatura, uma temperatura muito elevada não permite a hibridização. Se a temperatura for muito baixa, há formação de híbridos que não possuem os pares de bases correctos. A temperatura de fusão ideal tem que ser suficientemente baixa para permitir a hibridização entre o oligonucleótido e a cadeia de ADN molde, mas suficientemente alta para impedir que se formem híbridos com erros [64]. Esta temperatura pode ser estimada através da determinação da temperatura de fusão (*melting temperature,* T_m) pela fórmula: T_m (ºC) = 4 x (C + G) + 2 x (A + T)

A desnaturação do ADN é conseguida atingindo elevadas temperaturas, que promovem a separação da dupla hélice em cadeias simples, funcionando as cadeias como molde para a síntese de novas cadeias. A reacção utiliza um par iniciadores (*primers*), sequências de oligonucleótidos complementares com a cadeia padrão de ADN, que hibridizam com as cadeias opostas e delimitam a sequência alvo que se

pretende amplificar. Os iniciadores são fragmentos sintéticos de ADN (oligonucleótidos) que se ligam especificamente ao início da sequência alvo. Quanto maior for o fragmento a amplificar, maior é a dificuldade em obter resultados consistentes. Os oligonucleótidos não podem ser muito grandes (diminuem a velocidade de hibridização, reduzindo o número de moléculas amplificadas), nem muito pequenos (podem hibridizar com sequências que não as alvo).

A ligação dos oligonucleótidos à cadeia molde é seguida de extensão dos oligonucleótidos a uma temperatura mais elevada que a da fase anterior. O alongamento dos oligonucleótidos é catalisado pela enzima *Taq* polimerase, uma ADN polimerase termostável isolada a partir da eubactéria termofílica *Thermus aquaticus*. Uma segunda cadeia de ADN complementar é sintetizada ao longo da sequência alvo. No final de cada ciclo, o ADN é duplicado na área delimitada pelos iniciadores. A passagem de uma fase para a outra ocorre de forma suave e é permitida pelo termociclador.

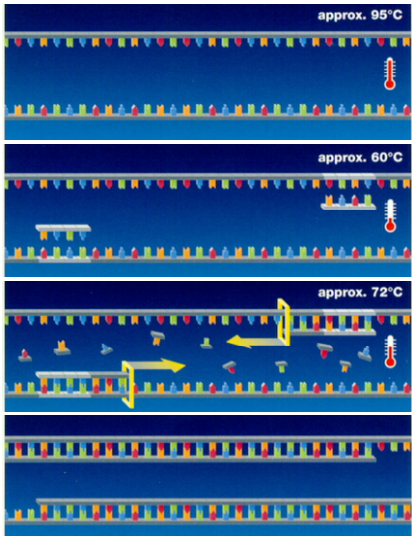

Figura 2.3: Esquema representativo de um ciclo de PCR. (Retirado de IQ-PCR, Immuno AG, 1996).

3.2.7. Transcrição Reversa do ARNm Extraído

Este procedimento é iniciado imediatamente após a extracção e eluição do ARN. Foi utilizado o *kit High-capacity cDNA Archive* (Applied Biosystems), cujos reagentes necessários à preparação da mistura de PCR foram descongelados, com excepção das enzimas *Multiscribe RT* e *RNAsin*® 20 U/µL (Promega).

A um *eppendorf* de 200 µL foram adicionados 25 µL de ARN. O tubo foi colocado no termociclador (T Personal Basic, Biometra) e incubado a 65ºC durante 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 25 µL da mistura de reacção contendo tampão RT 10x, *random primers* $d(N)_6$ 10 µM, dNTP's 25 µM, *MultiScribe RT* 50U/µL e *RNAsin*® 20U/µL. A reacção de transcrição reversa foi realizada no termociclador T Personal Basic (Biometra), que executou uma incubação a 25ºC durante 10 minutos, 37ºC, durante duas horas, seguida de um passo de inactivação enzimática, a 65ºC durante 10 minutos.

3.3. Estudos moleculares do Gene F8

3.3.1. PCR Longo - Inversão do intrão 22 do gene *F8*

Geralmente, a *Taq* DNA polymerase comum tem dificulade em amplificar fragmentos de ADN superiores a 5 Kb. Presume-se que isto aconteça, em parte, devido à impossibilidade de corrigir dNTP mal incorporados. A taxa de extensão da cadeia a partir da incorporação de dNTP incorrectos é reduzida, provocando uma diminuição no rendimento da síntese de produtos longos de ADN.

A reacção de PCR Longo usa duas polimerases: esta mistura de enzimas permite a formação de produtos de PCR de tamanho superior a 3 Kb. No PCR Longo, a produção de fragmentos de ADN de tamanho superior a 5 Kb é conseguida

através da utilização de uma mistura de ADN polimerases termoestáveis: uma non-*proofreading* que é a que existe em maior concentração e uma com actividade exonucleotídica 3' para 5' (*proofreading*) presente numa concentração mais baixa. Este tipo de propriedade permite a detecção e remoção de bases incorrectamente incorporadas. A reacção de PCR torna-se mais lenta, mas permite a formação de produtos mais longos.

A reacção de PCR Longo foi realizada num volume final de 25 μL contendo 200-300 ng de ADN genómico, 1 U da mistura de ADN polimerases DyNAzyme EXT DNA Polymerase (Finnzymes, Finland), tampão 3 do *kit* Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics, GmbH), 7,5% DMSO, 250 μM dGTP, 250 μM deaza-dGTP and 500 μM of the other dNTP's. As regiões homólogas do intrão 22, intra e extragénicas, foram amplificadas com 3 primers (A, P e Q) [65] utilizados na concentração final de 1.8, 1.8 e 0.5 μM, respectivamente (Tabela VI). Para efeitos de diagnóstico, apenas duas das quatro combinações de pares de *primers* (P+Q e Q+A) foram consideradas suficientes para dar um resultado conclusivo. As condições de amplificação encontram-se descritas na Tabela VII. O produto da reacção foi resolvido (*Horizon®, Life Techonologies)* utilizado um marcador de ADN de 1 Kb (1 Kb ADN Plus, Invitrogen) num gel de agarose 0,4% (p/v) corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e visualizado sob luz UV num transiluminador *Vilbert Lourmat*, após 17 horas/15 V.

A técnica de PCR Longo é realizada com *Hot Start*. O ADN padrão e os *primers* são misturados inicialmente e mantidos a uma temperatura inferior ao limiar de ligação não específica do primer ao ADN molde. Com este método, os primers não têm possibilidade de se ligar de forma não específica. A utilização de DMSO - co-solvente que destabiliza o ADN quebrando o emparelhamento das bases e

facilitando a separação da dupla cadeia de ADN - aumenta o rendimento e especificidade da reacção de PCR em amostras ricas em regiões GC. Esta técnica permite com exactidão, de forma simples, rápida e directa permitir o diagnóstico de hemofílicos A severos e portadoras.

Tabela VI: Sequência nucleotídica dos primers utilizados na técnica de PCR Longo [65].

Designação Oligonucleótido	Sequência (5' para 3')	Tamanho
P	GCCCTGCCTGTCCATTACACTGATGACATTATGCTGAC	38 mer
Q	GGCCCTACAACCATTCTGCCTTTCACTTTCAGTGCAATA	39 mer
A	CACAAGGGGGAAGAGTGTGAGGGTGTGGGATAAGAA	36 mer

Tabela VII: Condições do programa de PCR Longo **[66]**.

Etapas	Condições de amplificação	
Desnaturação inicial	94º C, 2 min	
Desnaturação	94º C, 10s	94º C, 10s
Fusão	65º C, 30s	65º C, 30s
Extensão	68º C, 12 min	68º C, 12 min + 20s por ciclo
N.º ciclos	x10	x20

(Abreviaturas: s – segundos; min – minutos)

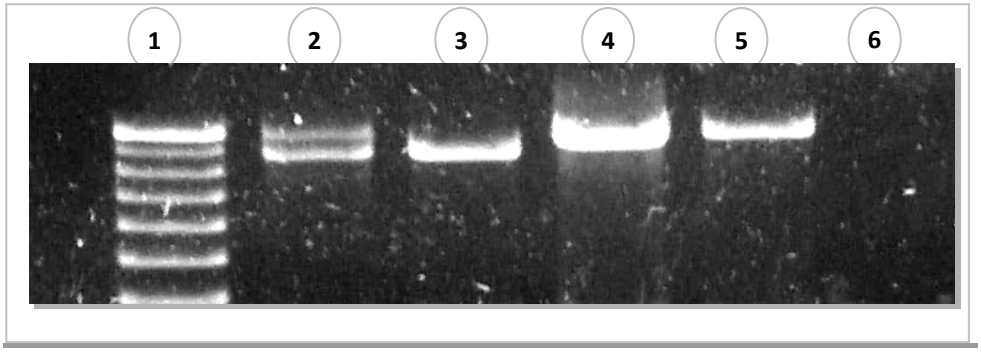

Figura 2.4: Electroforese em gel de agarose 0,4% dos produtos de PCR obtidos após realização do PCR Longo para IVS22. Legenda: 1 - Marcador 1 Kb; 2 - Portadora; 3 - Inversão do intrão 22; 4 - Normal; 5 - Normal; 6 - Branco

Alguns dos hemofílicos foram estudados previamente no Centro de Hemofilia do C.H.C., E.P.E., para a Inversão do Intrão 22 do gene do *F8* por *Southern blot* com digestão pela ezima *Bcl*I, utilizando um fragmento de 0,9 Kb do plasmídeo p482.6 como sonda.

3.3.2. PCR *Multiplex* - Inversão do intrão 1 do gene *F8*

A reacção de PCR *Multiplex* foi realizada num volume final de 25 μL contendo 200-300 ng de ADN genómico, 1 U *Taq Platinium* (Invitrogen), tampão da enzima (Invitrogen), dNTP's 2,5 mM, 7,5% DMSO. As regiões homólogas do intrão 1 (intra e extragénica), foram amplificadas com os primers 9cR, 9F, 1h-2F e 1h-2R na concentração de 50 ng/μL (Tabela VIII). As condições de amplificação encontram-se descritas na Tabela IX, *Termociclador Biometra*. O produto da reacção foi resolvido (*Horizon®, Life Techonologies,* 120V/45min), utilizando um marcador de ADN de 1 Kb (1 Kb ADN Plus, Invitrogen) num gel de agarose 0,4% (p/v) corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e visualizado sob luz UV /transiluminador *Vilbert Lourmat.*

Tabela VIII: Sequência nucleotídica dos oligonucleótidos utilizados na técnica de PCR *Multiplex* [49].

Designação Oligonucleótido	Sequência (5' to 3')	Tamanho
*F8*Intron1- 9F	GTTGTTGGGAATGGTTACGG	20mer
*F8*Intron1- 9cR	CTAGCTTGAGCTCCCTGTGG	20mer
*F8*Intron1h- 2F	GGCAGGGATCTTGTTGGTAAA	21mer
*F8*Intron1h- 2R	TGGGTGATATAAGCTGCTGAGCTA	24mer

Tabela IX: Condições do programa de PCR Longo [49].

Etapas	Condições do programa	N.º ciclos
Desnaturação Inicial	94ºC – 3'	1
Desnaturação, Fusão, Extensão	94ºC – 30''; 65ºC – 30''; 72ºC – 2'	30
Extensão Final	72ºC – 3'	1

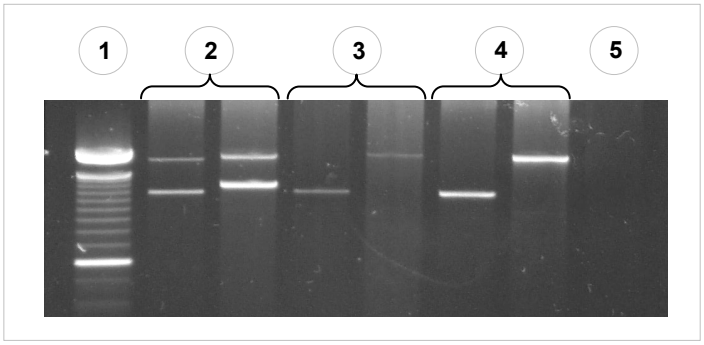

Figura 2.5: Inversão do Intrão 1 do gene do FVIII. Legenda: 1 - 100 pb ADN ladder; 2 - portadora; 3 e 4 - amostras normais; 5 - branco da reacção *inth1*.

3.3.3. Amplificação e sequenciação do Gene *F8* - PCR da região promotora, regiões exónicas e intrónicas flaqueantes

A reacção de PCR foi realizada num volume final de 50 μL contendo 200-300 ng de ADN genómico, 1 U *Taq Platinium* (Invitrogen), tampão da enzima (Invitrogen), dNTP's 2,5 mM, *primers* numa concentração de 50 ng/μL. As condições de amplificação encontram-se descritas na tabela X (T Personal, Biometra). O produto da reacção foi resolvido num gel de agarose 1% (*Horizon®, Life Techonologies,* 120V/45min), juntamente com um marcador de ADN de 100 pb (100 pb ADN Plus, Invitrogen) (p/v) corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e visualizado sob luz UV num transiluminador *Vilbert Lourmat.*

A sequência dos *primers* para a região promotora, exões 1-26 e respectivas zonas intrónicas flanqueantes foi escolhida de acordo com [67]. Todos os *primers* foram desenhados de modo a abranger 20 nucleótidos da respectiva região intrónica, e originando fragmentos de tamanho semelhantes. Para o exão 14, dada a sua extensão, foram desenhados vários *primers* com zonas de sobreposição. Com este critério, foi possível optimizar todas as reacções PCR com a mesma temperatura de *annealing* de modo a amplificar todo o gene com um programa único (Tabela X).

Tabela X: Condições do programa de PCR [67].

Etapas	Condições do programa	N.º ciclos
Desnaturação Inicial	94ºC - 3’	1
Desnaturação, Fusão, Extensão	94ºC - 20’’; 57ºC - 30’’; 72ºC - 1’	34
Extensão Final	72ºC - 3’	1

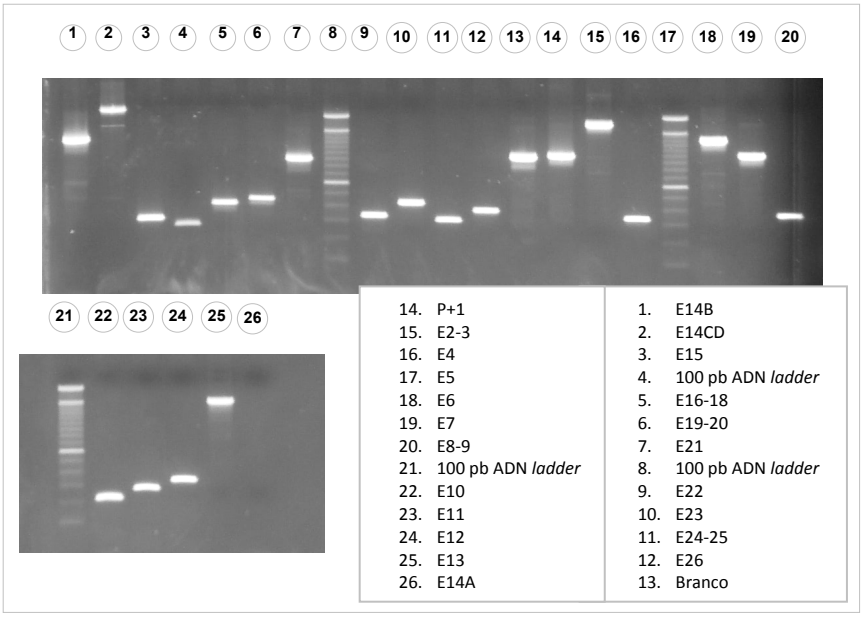

Figura 2.6: Electroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR obtidos na amplificação do gene *F8*.

3.3.3.1. Purificação com ExoSAP-IT®

A sequenciação nucleotídica directa necessita de produtos de PCR puros. No final de uma reacção de PCR, os dNTP’s não consumidos, assim como os *primers*, permanecem em solução com o ADN de cadeia dupla sintetizado. A existência de tais substâncias juntamente com o produto a processar irá interferir com os resultados que se desejam obter. Para tal, é necessária a purificação dos produtos de PCR obtidos. A adição directa e proporcional de uma mistura de enzimas hidrolíticas ExoSAP-IT® (USB Corporation, USA), Exonuclease I e Fosfatase Alcalina de camarão, permite a remoção de tais substâncias da solução. A enzima

Exonuclease I degrada *primers* residuais e ADN de cadeia simples produzido durante a reacção de PCR. A Fosfatase Alcalina de camarão hidrolisa os dNTP's remanescentes na mistura da PCR. A mistura de enzimas apresenta uma actividade óptima a 37º C e funciona no tampão de PCR.

A 2 μL de ExoSAP-IT® foram adicionados 8 μL de produto de PCR. A reacção de purificação ocorreu num termociclador (Biometra T Personal e T Personal Basic, AlfaGene) com uma etapa de purificação a 37º C durante 15 minutos, seguida de uma etapa de inactivação enzimática a 80º C durante 15 minutos.

3.3.3.2. Sequenciação cíclica de ADN

A sequenciação foi efectuada pelo método de terminação de cadeia de Sanger *et al*.[68]. Este método consiste na síntese de cadeias a partir do fragmento de ADN a ser sequenciado que diferem entre si por um nucleotídeo. A síntese das cadeias truncadas é conseguida pelo uso de ddNTP's (didesoxirribonucleosídeos trifosfatados - ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), os quais, e ao contrário dos dNTP's (desoxirribonucleosídeos trifosfatados), não possuem o grupo 3'-OH. O *kit* de sequenciação cíclica *BigDye® Terminator v1.1* fornece os componentes necessários para a reacção de sequenciação num formato de pré-mistura. As reacções ciclícas de sequenciação são realizadas com nucleótidos marcados com fluorescência que são incorporados à medida que ocorre a extensão do *primer*. Usam-se baixas concentrações de ddNTP's e altas concentrações de dNTP's. Em cada reacção, um ddNTP é incorporado aleatoriamente na posição do dNTP correspondente, provocando a terminação da extensão (Figura 2.7).

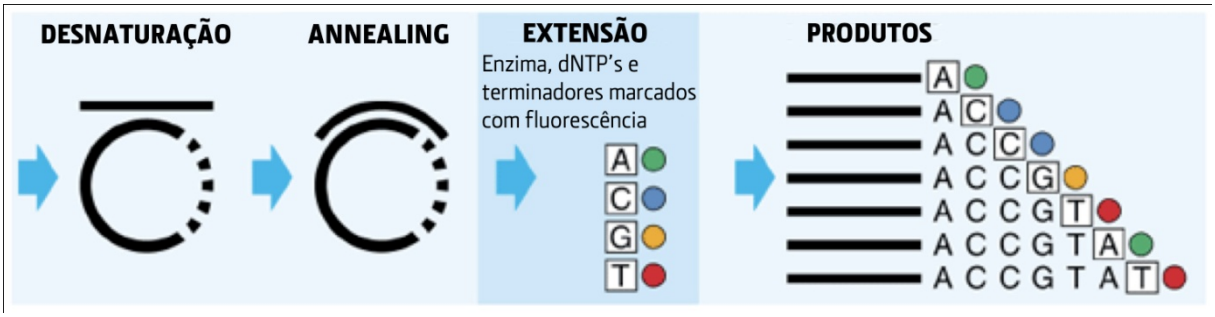

Figura 2.7: Esquema representativo de reacção de sequenciação cíclica, com ddNTP marcados com fluorocromos. (Retirado de Manual Sequenciação Applied Biosystems)

A reacção de sequenciação foi efectuada com 1 – 2 µL de *kit* de sequenciação BigDye® Cycle Sequencing v1.1, 0.5 µL de *primer* directo/reverso (3,2 pmol/µL) e 2,8 µL de produto de PCR, purificado por método enzimático, nas condições do programa de sequenciação (Tabela XI).

Tabela XI: Condições do programa de sequenciação.

Etapas	Condições do programa	N.º ciclos
Desnaturação Inicial	94ºC - 3'	1
Desnaturação, Fusão, Extensão	96ºC - 10''; 50ºC - 5''; 60ºC - 4'	25

A purificação dos produtos de sequenciação foi realizada em colunas DyeEx® (Qiagen) e posteriormente sujeita a concentração em centrífuga de vácuo à temperatura de 60ºC durante 10 – 15 minutos. O produto purificado foi hidratado com 20 µL Formamida Hi-Di e tranferido para tubos tipo *eppendorf* 0,5 mL com septa (ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) ou microplaca óptica (Hitachi 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

3.3.3.3. Electroforese capilar no sequenciador automático

A electroforese capilar de produtos de sequenciação nucleotídica foi efectuada nos sequenciadores de capilares ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer ou Hitachi 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Trata-se de uma técnica de separação realizada em capilares de sílica com um diâmetro interno aproximado de 50 μm. Permite separar uma mistura complexa de moléculas de grande e pequeno tamanho. O capilar encontra-se cheio de Polímero POP-6 ou POP-4 (Applied Biosystems) e as suas extremidades mergulhadas em tampão 10x EDTA. O capilar é interrompido num determinado local, permitindo a sua adaptação a um detector LASER. A amostra é carregada junto ao ânodo. O pequeno volume de amostra aspirado permite a aplicação de um campo eléctrico de elevada voltagem (p. ex.: 15 mV) que separa as moléculas com base na carga, tamanho e hidrofobicidade. Esta técnica é uma adaptação da eletroforese tradicional em gel de agarose a um capilar, utilizando polímeros como suporte físico da separação das moléculas. Isto permite que os analitos com razões de carga/massa semelhantes sejam separados pelo tamanho.

Após electroforese os dados são obtidos e analisados pelo programa *Sequencing Analysis*, versão 3.3 e 5.3.1 (Applied Biosystems): análise das bases nucleotídicas através do ficheiro *basecaller* ABI-CE1 versão 3.3.2 e KB.bcp e ficheiros de mobilidade *DyeSet/DyePrimer* 310_POP6_BDTv1.mob e 3130_POP6_BDTv1.mob.

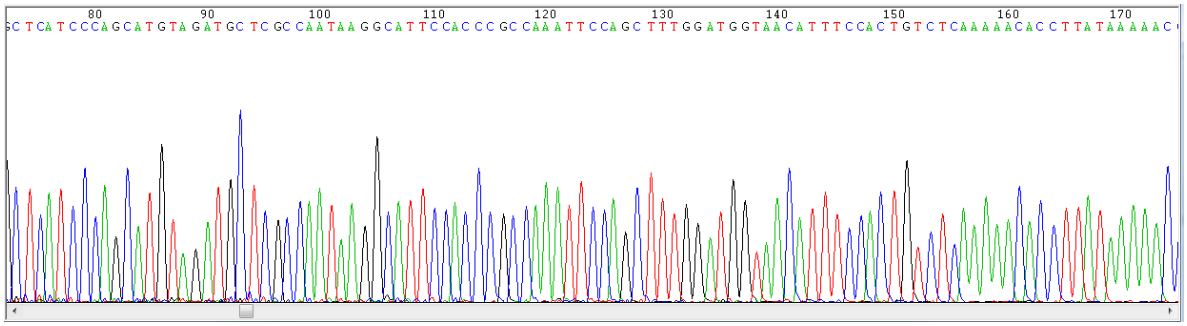

Figura 2.8: Electroferograma de uma reacção de sequenciação analisada pelo programa *Sequencing Analysis 5.2.1* (Applied Biosystems).

3.3.3.4. Análise de sequências - Comparação dos dados obtidos com a sequência nativa do *F8* (*GenBank*)

Por meio de computador e com o auxílio de um programa de comparação de sequências (MacVector™ versão 7.2, Oxford e *SeqScape Software* 2.5, Apllied Biosystems), foram analisadas as sequências obtidas relativas a cada um dos exões e suas regiões intrónicas flanqueantes, e comparadas com a sequência nativa obtida a partir do *GenBank* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), número de acesso NP_000123.1.

Quando não ocorre emparelhamento entre a sequência nativa e as sequências obtidas, repete-se o procedimento num segundo produto de PCR.

Confirmando-se o não emparelhamento, é determinado o nucleótido alterado através do mesmo programa, contra a sequência do ARNm do FVIII (*GenBank*, referência M14133). O número correspondente a esse nucleótido é dividido por 3 para se determinar qual o codão alterado e são subtraídos 19 codões correspondentes ao pépido sinal. Tendo sido calculado o codão mutado, o mesmo é localizado e comparado no banco de dados internacional *HAMSTeRS*. A numeração das mutações adoptada foi a referida neste banco de dados [69, 70].

Figura 2.9: Imagem de um projecto de análise das sequências obtidas por electroforese capilar e da sua comparação com a sequência nativa do gene *F8*.

3.3.4. Análise de Fragmentos

A reacção de PCR *multiplex* foi optimizada com base na utilização de 4 pares de *primers* para amplificar numa única reacção 4 micro-satélites: 2 marcadores extragénicos, DXS1073 (repetição TG) e DXS1108 (repetição CA), e 2 marcadores intragénicos STR13 (repetição TG) e STR22 (repetição GT). No âmbito deste trabalho, avaliou-se o marcador STR22, localizado no intrão 22 do gene *F8* para delimitar uma grande delecção. A reacção foi preparada num volume final de 25 µL com solução *Master Mix* (Quiagen), *primers* na concentração de 2 µM e 50 -100 ng de ADN genómico. A sequência de *primers* foi obtida de [71]. Foram respeitadas as recomendações do fabricante do *kit* relativamente às condições de PCR (Tabela XII). A separação dos fragmentos obtidos foi efectuada por electroforese capilar no sequenciador automático 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). A análise foi

visual, uma vez que o intuito era verificar a presença ou ausência do marcador STR22 no intrão 22.

Tabela XII: Condições do programa de PCR para amplificação do STR22.

Etapas	Condições do programa	N.º ciclos
Desnaturação Inicial	95ºC - 15’	1
Desnaturação, Fusão, Extensão	94ºC - 20’’; 57ºC - 1’ 30’’; 72ºC - 1’	33
Extensão Final	72ºC – 60’	1

3.3.5. Pesquisa de grandes delecções/duplicações por Amplificação de Múltiplos Fragmentos dependentes de ligação de sonda (*MLPA*)

Ao estudo por MLPA foram subtidas amostras de DNA de indivíduos com suspeita de delecções devido à ausência de amplificação de produtos de PCR em sucessivas reacções e sem mutação identificada pela metodologia PCR/Sequenciação nucleotídica directa.

Foi utilizado o *kit* SALSA® MLPA® Kit P178 Factor VIII (MRC-Holland) e realizada uma PCR com sondas exão-específicas e sondas de referência, separação dos produtos obtidos por electroforese capilar e análise dos dados obtidos no GeneMapper 4.0 e Coffalyser 9.0. Para cada sonda/exão foi calculada uma razão controlo/amostra (intervalo de normalidade: 0.8 – 1.2). Valores inferiores ou superiores ao intervalo de normalidade indicam presença de número anómalo de cópias. Razões inferiores a 0.7 indicam heterozigotia para uma delecção [72-74].

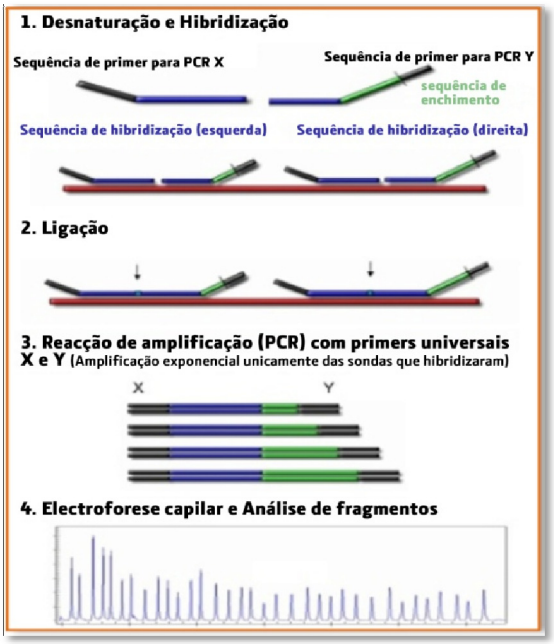

Figura 2.10: Representação esquemática da técnica MLPA. (Retirado e adaptado de http://www.mrc-holland.com)

3.4. Pesquisa de moduladores fenótipo - FV Leiden, PRT20210G/A por Allele Specific PCR Multiplex (ASPCR)

Para detectar modulação de fenótipo nos 43 doentes doentes com HA severa foi efectuado a pesquisa das mutações associadas à predisposição para trombose por *Allele Specific* PCR *Multiplex* (ASPCR) que inclui a pesquisa das mutações FV Leiden, PRT20210G/A e MTHFR C677T. A ASPCR utiliza mais do que um par de *primers* para amplificação selectiva da sequência normal e da sequência mutada. Neste caso são utilizados três pares de *primers* para cada uma das reacções: normal e mutada. Esta ASPCR permite que em apenas duas reacções por amostra se possam pesquisar três mutações em simultâneo. Na reacção mutada é utilizado um segundo *primer* reverso no gene da Protrombina que vai amplificar um fragmento que funciona como controlo positivo [75].

Cada reacção de PCR (Normal e Mutada) foi preparada para um volume total de 6 μL: 3.125 μL *Master Mix* Qiagen, 0.625 μL Q *Solution*, 0.625 μL mistura de

primers “N” ou “M” (50 ng/μL). Os *primers* e programa de PCR usados foram os descritos por Hessner *et al.* [75].

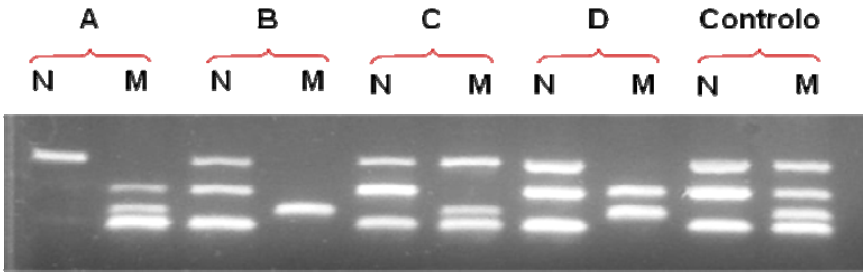

Figura 2.11: Padrão electroforético dos possíveis genótipos obtidos com esta metodologia. A) Normal para PRT 20210G/A e homozigótico para FV Leiden e MTHFR C677T; **B)** Normal para PRT 20210G/A, FV Leiden e MTHFR C677T; **C)** Heterozigótico para PRT 20210G/A e MTHFR C677T e normal para FV Leiden; **D)** Heterozigótico FV Leiden e normal para MTHFR C677T e PRT 20210G/A; Controlo – heterozigotia para as 3 mutações.

3.5. PCR Exões 18 a 27 do Gene FvW – Exclusão DvW tipo 2N

Nos HA ligeiros excluiu-se a DvW tipo 2N, por PCR/Sequenciação nucleotídica directa dos exões 18 a 27 do gene FvW, que codificam os domínios D3-D’ no FvW, local de ligação desta proteína ao FVIII [76].

As condições da reacção de PCR (Tabela X) sendo a sequência dos *primers* dos exões 18-27 e respectivas zonas intronicas flanqueantes escolhida de acordo com Schneppenheim *et al.* [77].

3.6. Modulação Molecular

De forma a avaliar a possível alteração funcional originada por novas mutações *missense*, efectua-se a sua modulação molecular, através da utilização do programa *Polyphen Software* (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph) que prediz o possível impacto da troca de aminoácido na estrutura e função do FVIII.

O *Polyphen*, servidor da *World Wide Web*, baseado na caracterização da sequência do local de substituição e parâmetros estruturais, automatiza uma explicação funcional para polimorfismos não sinónimos. Fornece um *position-specific independent count score* (PSIC) calculado a partir da semelhança geral de sequências que partilham o tipo de aminoácido nesta posição. Os resultados são apresentados de acordo com 3 graus de severidade: benigno (*bening*), possivelmente causa alteração (*possibly damaging*) e provavelmente causa alteração (*probably damaging*) [78]. Um *PSIC score* com valores elevados pode indicar que a substituição é raramente ou nunca observada na família proteica [79, 80].

A sequência proteíca do FVIII em formato FASTA (>gi|4503647|ref| NP_000123.1| *coagulation factor VIII isoform a precursor* [*Homo sapiens*]) foi obtida a partir do *GenBank Database* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) através do número de acesso NP_000123.1.

O efeito das mutações de *splicing* foi avaliado utilizando o programa *Human Splicing Finder*, versão 2.4 (http://www.umd.be/HSF/), uma ferramenta que permite predizer os efeitos das mutações nos locais de *splicing* ou identificar novas sequências de *splicing* [81].

3.7. Diagnóstico de Hemofilia A

O diagnóstico de HA é feito com base na história clínica do indivíduo e nos resultados laboratoriais. A classificação dos indivíduos com HA baseia-se na história clínica e na determinação laboratorial da quantidade de FVIII existente no plasma (Tabela II).

A existência de hemorragias pouco comuns num indivíduo do sexo masculino levanta suspeitas relativamente à sua causa e é motivo para realização de estudos funcionais de coagulação (testes de rastreio e testes confirmatórios) para diagnosticar a causa da alteração da hemostase. A DvW deve ser excluída antes de se chegar ao diagnóstico de HA, uma vez que afecta ambos os sexos e é uma patologia hemorrágica relativamente frequente, com uma prevalência de 1-2% [22, 23].

O diagnóstico laboratorial de HA é atingido quando se obtém, nos testes de rastreio, um TTPA prolongado na presença de uma contagem de plaquetas normal e, nos testes confirmatórios, valores quantitativa e qualitativamente normais de FvW (Fvw:Ag e FvW:Act) e actividade do FVIII com valor inferior a 50% do normal.

Capítulo III

RESULTADOS

III. RESULTADOS

1. RESULTADOS DOS ESTUDOS MOLECULARES

O estudo molecular foi efectuado em 141 indivíduos com Hemofilia A pertencentes a 103 famílias não relacionadas. As alterações genéticas responsáveis pelo fenótipo foram identificadas em 102/103 famílias. Num doente de origem Cabo Verdeana, com fenótipo severo, foi exaustivamente estudado o gene *F8* e não foi detectada nenhuma alteração molecular nas regiões promotora, codificantes nem nas regiões de *splicing*.

Um total de 46 mutações diferentes foram identificadas, das quais 23 não tinham sido previamente descritas (*HAMSTeRS*).

Tabela XIII: Número de famílias estudadas, número e tipo de alterações detectadas.

Severidade	Famílias (n.º)	IVS 22	IVS1	Mutações Missense	Mutações Nonsense	Mutações Splicing	Pequenas delecções/Inserções	Grandes delecções	Duplicação parcial do gene
Severa	52	26	2	3	3	4	10	2	1
Moderada	7			7					
Ligeira	44			40		1	3		

1.1. Estudo Funcional, Imunológico e Molecular de 23 Novas Mutações

A caracterização funcional e imunológica dos doentes com mutações novas demonstrou uma correlação equilibrada entre FVIII:C e FVIII:Ag (CRM negativa e CRM reduzida): doentes com HA severa, moderada e ligeira apresentaram níveis de FVIII:Ag <1%, 1% e 17,8%±16,4, respectivamente (Tabela XIV). Em todos os casos, os níveis de actividade e antigénio do FvW eram normais. A pesquisa molecular de DvW tipo 2N nos hemofílicos ligeiros foi negativa.

Tabela XIV. Resultados dos estudos funcionais e imunológicos dos HA com novas mutações

Grupo	*TP (seg.)*	*TTPA (seg.)*	*FVIII scr (%)*	*FVIII:C (%)*	*FVIII:Ag (%)*	*FvW:Ag (%)*	*FvW:Act (%)*
Severos n=11	12,8±3,3	98,4±38,4	ND	0,11±0,32	0,42±1,4	105,4±29	95,5±26
Moderados n=2	12,5±1,4	62±19,8	ND	2,7±2	1*	93±19,8	101,5±26,8
Ligeiros n=10	12,6±1,7	49±14,4	26,9±22,4	9,2±6,6	17,8±16,4	96,2±31,8	95±39,4

Seg: segundos; ND: Não determinado; * Determinado em apenas um indivíduo;

Vinte e três das mutações identificadas, em 28 famílias são descritas pela primeira vez: 11 mutações *missense* (48%), 2 grandes delecções (9%), 3 mutações de *splicing* (13%), 2 mutações *nonsense* (9%), 4 pequenas delecções/inserções (17%) e uma duplicação parcial do gene *F8* (4%) (Figura 3.1).

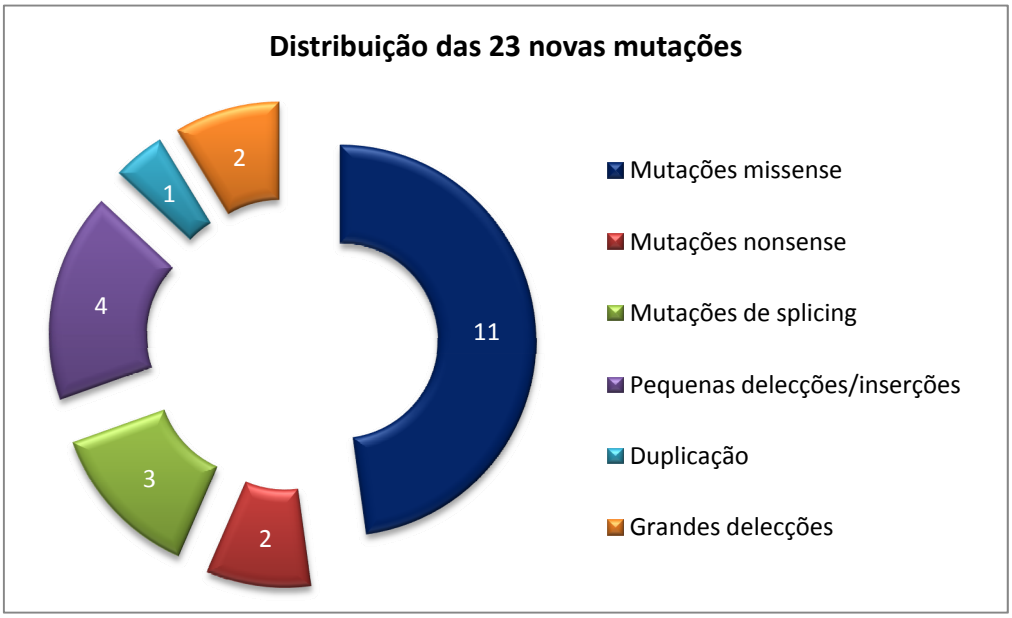

Figura 3.1: Representação gráfica da distribuição das 23 novas mutações identificadas no gene *F8*.

As mutações *missense* p.Val96Phe, p.Tyr431Cys, p.Val663Ala, p.Phe1876Ser e p.Asn1894Ser foram encontradas em 8 famílias. As mutações p.Tyr431Cys e p.Asn1894Ser foram identificadas em mais do que uma família. Em 5

das famílias apenas foi possível estudar o propósito. A mutação p.Leu71Pro foi identificada num propósito, de uma mãe não portadora: mutação *de novo*. A sequenciação do gene *F8* nestes doentes (região promotora, regiões codificantes e regiões intrónicas flanqueantes) não identificou outras alterações.

A mutação de *splicing* c.2114-1 G>T (Ex14-1 G>T), a delecção c.2826_2831delAA (p.Lys925fsX6) e a inserção c.129insT (p.Leu24*fs*X14) foram identificadas em 3 propósitos e não foi possível estudar outros elementos das respectivas famílias.

De um de total de 28 famílias, apenas em 20 (20/28 - 17 mutações distintas) foi possível identificar o padrão de hereditariedade (Tabela XV).

A avaliação do impacto das alterações de aminoácido, identificadas no grupo de indivíduos com novas mutações *missense* foi efectuada através do programa *Polyphen Software*: 6 alterações foram classificadas como "*Probably damaging*", 2 como "*Possibly damaging*" e 3 como "*Bening*" (Tabela XV).

O efeito das mutações de *splicing* foi avaliado através do programa *Human Splicing Finder.* As 3 alterações identificadas ocorreram no local da sequência consenso *splicing*: em 2 locais aceitadores de *splicing* em que ocorreu perda desse local e em 1 local dador de *splicing*, que originou criação de novo local de *splicing*. (Tabela XV).

Tabela XV: Novas mutações identificadas. Modulação molecular: *Polyphen* (mutações *missense*) e *Human Splicing Finder* (mutações de *splicing*).

Identificação	Fenótipo	Domínios	Modulação molecular
Mutações Missense			***Polyphen (PSIC score)***
p.Leu71Pro	Severo	A1	*Possibly damaging* (1,917)
p.Val96Phe	Moderado	A1	*Possibly damaging* (1,520)
p.Tyr431Cys **(n=3)**	Ligeiro	A2	*Probably damaging* (2,407)
p.Tyr511Cys	Ligeiro	A2	*Probably damaging* (2,407)
p.Val601Met	Ligeiro	A2	*Bening* (1,022)
p.Val663Ala	Ligeiro	A2	*Bening* (1,022)
p.Phe1876Ser	Ligeiro	A3	*Probably damaging* (2,225)
p.Asn1894Ser **(n=2)**	Ligeiro	A3	*Bening* (1,494)
p.Gln2246Lys	Ligeiro	C2	*Probably damaging* (1,432)
p.Gly2285Arg	Ligeiro	C2	*Probably damaging* (2,031)
p.Pro2300Arg	Moderado	C2	*Probably damaging* (2,325)
Mutaçoes Nonsense			
p.Ser170X	Severo	A1	-
p.Gln783X	Severo	B	-
Mutaçoes Splicing			***HSF Score (Nativo-Mutado)***
c.1010 -2A>C (IVS7-2 A>C)	Severo	A1 - A2	**Perda local *splicing* 87.9 – 58.9**
c. 2114 -1G>T (Ex14-1 G>T)	Severo	A2 - B	**Perda local *splicing* 92.7 – 63.8**
c.6900 +1G>C (IVS25+1 G>C)	Ligeiro	C2	**Criação de local *splicing* alternativo 50.9 – 76.6**
Pequenas delecções/ inserções			
c.2826_2831delAA (p.Lys925fsX6)	Severo	B	-
c.5962_5964delGAG (p.1696delGlu) **(n=2)**	Ligeiro	A3	-
c.129insT (p.Leu24fsX14)	Severo	A1	-
c. 2551_2563dup13bp (p.836ThrfsX2) **(n=2)**	Severo	B	-
Grandes delecções			
c.(?_-30)_(387_?) Delecção Promotor – Exão 3	Severo	A1	-
c.(6244_?)_(?_6430) Delecção Exão 21(parcial) – Exão 22	Severo	C1	-
Grande duplicação			
c.(?_787)_(6429_?) Duplicação Exões 7-22	Severo	A1 – C1	-

1.2. Inversão do Intrão 22 e Inversão do Intrão 1

Em 52 famílias com Hemofilia A severa, a IVS22 foi identificada em 26 (51%) e a IVS1 em 2 (4%). Apenas 2 casos de IVS22 são *de novo*, as mães não são portadoras e em 3 casos não foi possível estabelecer o padrão de hereditariedade.

1.3. Mutações Pontuais - Mutações Missense

Foram identificadas 50 mutações *missense*, das quais 9/50 foram encontradas em mais do que uma família. Onze destas mutações não tinham sido previamente descritas (Tabela XVI).

A mutação p.Gln2189Glu, no exão 24 do gene *F8* foi encontrada em 15 indivíduos aparentemente não relacionados.

Tabela XVI. Mutações *missense* identificadas em famílias com Hemofilia A. As mutações novas encontram-se em destaque.

Mutações missense							
n	***Exão***	***Alteração Nucleotídica***	***Codão***	***Troca Aminoácido***	***Domínio***	***Severidade***	***CpG***
1	**3**	**c.269 T>C**	**CTG CCG**	**p.Leu71Pro**	**A1**	**Severa**	**Não**
1	**3**	**c.343 G>T**	**GTC TTC**	**p.Val96Phe**	**A1**	**Moderada**	**Não**
1	7	c.923 C>T	TCG TTG	p.Ser289Leu	A1	Ligeira	Sim
1	8	c.1091 A>G	TAT TGT	p.Tyr346Cys	*α1*	Ligeira	Não
3	**9**	**c.1347 A>G**	**TAC TGC**	**p.Tyr431Cys**	**A2**	**Ligeira**	**Não**
1	**11**	**c.1589 A>G**	**TAT TGT**	**p.Tyr511Cys**	**A2**	**Ligeira**	**Não**
2	11	c.1636 C>T	CGG TGG	p.Arg527Trp	A2	Ligeira	Sim
3	11	c.1648 C>T	CGC TGC	p.Arg531Cys	A2	Moderada/Ligeira	Sim
2	12	c.1834 C>T	CGC TGC	p.Arg593Cys	A2	Moderada/Ligeira	Sim
1	**12**	**c.1858 G>A**	**GTG ATG**	**p.Val601Met**	**A2**	**Ligeira**	**Não**
1	**13**	**c.2045 T>C**	**GTC GCC**	**p.Val663Ala**	**A2**	**Ligeira**	**Não**
3	14	c.2167 G>A	GCC ACC	p.Ala704Thr	A2	Moderada	Sim
1	14	c.5144 G>A	CGA CAA	p.Arg1969Gln	A3	Ligeira	Sim
1	**17**	**c.5684 T>C**	**TTT TCT**	**p.Phe1876Ser**	**A3**	**Ligeira**	**Não**
1	17	c.5726 A>G	TAC TGC	p.Tyr1890Cys	A3	Severa	Não
2	**17**	**c.5738 A>G**	**AAT AGT**	**p.Asn1894Ser**	**A3**	**Ligeira**	**Não**
1	18	c.5824 G>C	GGC CGC	p.Gly1923Arg	A3	Severa	Sim
1	23	c.6505 C>T	CGT TGT	p.Arg2150Cys	C1	Ligeira	Sim
2	23	c.6532 C>T	CGC TGC	p.Arg2159Cys	C1	Ligeira	Sim
15	24	c.6622 C>G	CAG GAG	p.Gln2189Glu	C2	Ligeira	Não
3	24	c.6623 A>G	CAG CGG	p.Gln2189Arg	C2	Ligeira	Não
1	**25**	**c.6793 C>A**	**CAG AAG**	**p.Gln2246Lys**	**C2**	**Ligeira**	**Não**
1	**26**	**c.6910 G>A**	**GGA AGA**	**p.Gly2285Arg**	**C2**	**Ligeira**	**Não**
1	**26**	**c.6954 C>G**	**CCG CGG**	**p.Pro2300Arg**	**C2**	**Moderada**	**Sim**

As 50 mutações *missense* afectam a cadeia pesada ou a cadeia leve do FVIII, predominantemente os domínios A2 e C2. Não foram encontradas mutações que afectem o domínio B (Figura 3.2).

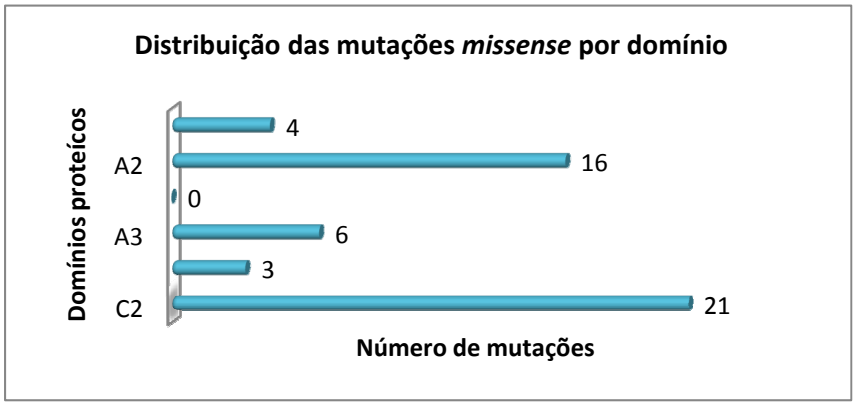

Figura 3.2: Distribuição gráfica das mutações missense pelos domínios proteicos do FVIII.

A maioria das mutações *missense* foi encontrada em doentes com fenótipo ligeiro e moderado (Figura 3.3). Apenas 3 das mutações *missense* foram encontradas em doentes com fenótipo severo (p.Leu71Pro, p.Tyr1890Cys e p.Gly1923Arg): 2 ocorreram no domínio A3 e 1 no domínio A1 (Tabela XVI).

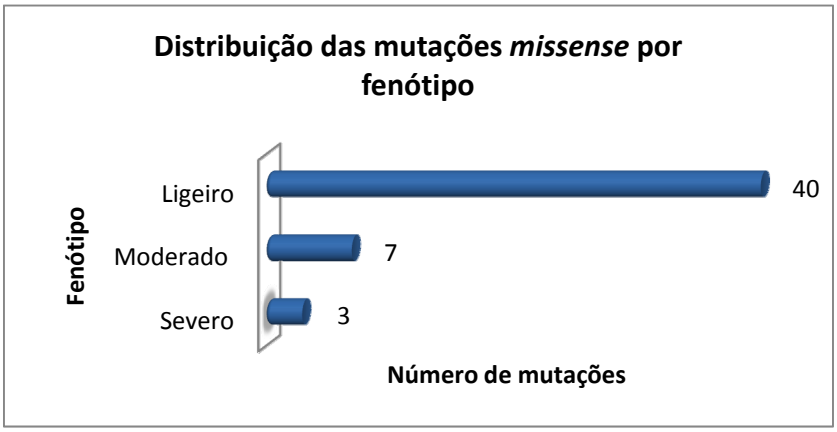

Figura 3.3: Distribuição gráfica das mutações *missense* por fenótipo.

A maioria das mutações *missense* é de transição (62%). Tinta e dois por cento ocorreram em locais CpG, reconhecidos pela sua hipermutabilidade.

1.4. Mutações Pontuais - Mutações Nonsense

Foram identificadas 3 mutações *nonsense* distintas no grupo de indivíduos com hemofilia A severa: p.Ser170X, p.Gln626X e p.Gln783X, duas delas não citadas na base de dados internacional para Hemofilia A - HAMSTeRS (Tabela XVII). A troca nucleotídica origina codões de terminação prematuros.

Tabela XVII. Mutações identificadas em famílias com Hemofilia A. As mutações novas encontram-se em destaque.

Mutações nonsense							
n	***Exão***	***Alteração Nucleotídica***	***Codão***	***Troca Aminoácido***	***Domínio***	***Severidade***	***CpG***
1	**4**	**c. 566 C>A**	**TCA>TAA**	**p.Ser170X**	**A1**	**Severo**	**Não**
1	13	c. 1933 C>T	CAG>TAG	p.Gln626SX	A2	Severo	Não
1	**14**	**c. 2404 C>T**	**CAA>TAA**	**p.Gln783X**	**B**	**Severo**	**Não**

Todas as mutações *nonsense* foram identificadas em mais do que um elemento da mesma família.

1.5. Mutações Pontuais - Mutações Splicing

Foram identificadas 5 mutações *de splicing* distintas (Tabela XVIII), 3 delas não reportadas anteriormente em *HAMSTeRS*. Três são em locais aceitadores e 2 em locais dadores de *splicing*. Todos os doentes têm fenótipos severos, excepto o que tem a mutação c.6900+1 G>C (IVS25+1 G>C) que tem fenótipo ligeiro.

Tabela XVIII. Mutações de *splicing* identificadas em famílias com Hemofilia A. As mutações novas encontram-se em destaque.

Mutações de Splicing					
n	***Intrão***	***Alteração Nucleotídica***	***Domínio***	***Severidade***	***Comentário***
1	1	c.144 -1G>A (ag/A>aa/A)	A1	Severa	IVS1 -1 aceitador de *splicing*
1	3	c.388+5G>A(AGG/gtgag>AGG/gtgaa)	A1	Severa	IVS3+5 dador de *splicing*
1	**7**	**c.1010 -2A>C (ag/ATG>cg/ATG)**	**A1**	Severa	**IVS7-2 aceitador de *splicing***
1	**13**	**c. 2114 -1G>T(ag/GTC>at/GTC)**	**B**	Severa	**Ex14-1 aceitador de *splicing***
1	**25**	**c.6900 +1G>C (AAG/gt>AAG/ct)**	**C2**	**Ligeira**	**IVS25+1 dador de *splicing***

1.6. Pequenas Delecções e Inserções

Foram identificadas 5 pequenas inserções (<50 pb) e 8 pequenas delecções (<50 pb). Todos os doentes têm fenótipo severo, excepto os 2 com a delecção *inframe* c.5962_5964delGAG (codão 1969Glu) e 1 com c.3628_3637delA que têm fenótipo ligeiro (Tabela XIX). Esta última mutação, em que há delecção de uma Adenina numa sequência de 9 Adeninas no Exão 14, é previsível que dê origem a um codão de terminação prematuro (*fs*X4) e foi identificada em 2 indivíduos com fenótipo severo.

Tabela XIX. *Pequenas delecções e inserções* identificadas nas familias com hemofilia A. As mutações novas encontram-se em destaque.

Pequenas delecções e inserções							
n	***Exão***	***Natureza da inserção/delecção***	***Mutação***	***Codão***	***Domínio***	***Severidade***	***Comentário***
1	**1**	**c.129insT**	**p.Leu24*fs*X14**	**24**	**A1**	**Severo**	**Frameshift**
1	14	c. 2945insA	p.Asn*fs*X22	961-3	B	Severo	Frameshift
1	14	c.3628_3637insA	p. Lys*fs*X37	1191-4	B	Severo	Frameshift
2	**14**	**c. 2563dup13bp**	**p.836Thr*fs*X2**	**836-840**	**B**	**Severo**	**Frameshift**
2	**18**	**c.5962_5964delGAG**	**p.1696delGAG**	**1969**	**A3**	**Ligeira**	**Delecção**
1	2	c.206_212delTGTT	p.Phe52*fs*X5	50-51/51-	A1	Severo	Frameshift
1	**14**	**c.2826_2831delAA**	**p.Lys925*fs*X6**	**923-925**	**B**	**Severo**	**Frameshift**
2	14	c.3628_3637delA	p.Lys1194*fs*X4	1191-4	B	Severo	Frameshift
1*	14	c.3628_3637delA	p.Lys1194*fs*X4	1191-4	B	Ligeira	Correcção do quadro de leitura?
HM3752HA	14	c.4372_4379delA	p.Asn1141*fs*X5	1439-41	B	Severo	Frameshift

* Realizado estudo de ADN do sangue periférico total, ADNc de linfócitos do sangue periférico e ADN da mucosa bucal; …

No indivíduo com fenótipo ligeiro, com níveis de FVIII:C - 15% e FVIII:Ag – 19%, foram estudadas amostras de ADN de sangue periférico total, ADNc de linfócitos do sangue periférico e ADN das células da mucosa bucal. Todas as amostras apresentaram o mesmo padrão de sequenciação nucleotídica onde aparece uma sequência com a mutação, e outra em paralelo, aparentemente normal e de menor intensidade (Figura 3.4).

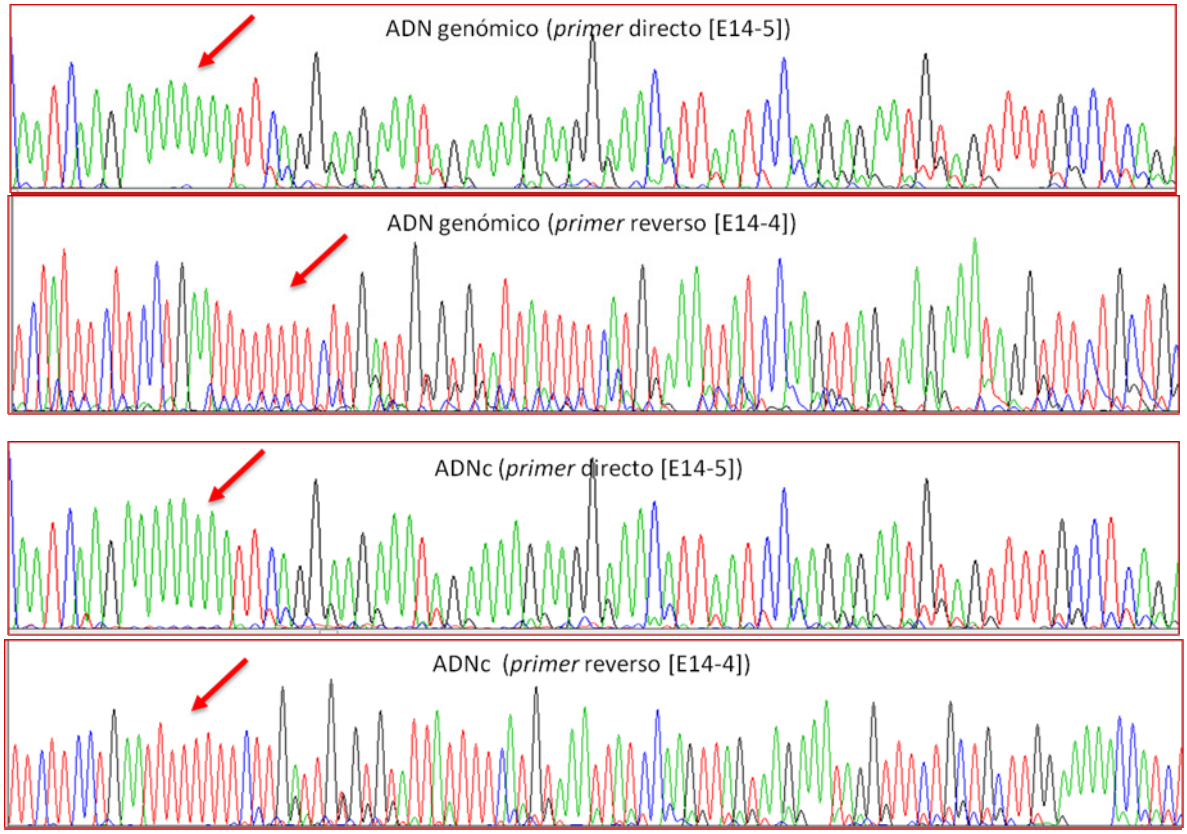

Figura 3.4: Electroferogramas obtidos após sequenciação nucleotídica directa com primers directo (E14-5) e reverso (E14-4) de produtos de PCR obtidos de amostra de ADN genómico e ADN complementar (obtido após extracção de ARNm de linfócitos) do indivíduo com a mutação c.3637delA (p.1194fsX4) no exão 14 do gene *F8*. As setas indicam o local da mutação. É possivel observar a existência de uma sequência paralela à de maior intensidade, a partir do local da mutação.

1.7. Grandes Delecções

Foram identificadas 2 grandes delecções (> 50 pb) em 2 famílias com HA severa (Tabela XX).

Numa família a pesquisa das inversões IVS22 e IVS1 foi negativa e em sucessivas tentativas de amplificação por PCR da Região Promotora, Exões 1, 2 e 3 do gene *F8* não se obtiveram fragmentos. A técnica de MLPA revelou ausência de hibridização com as sondas complementares da Região Promotora, Exões 1, 2 e 3. O padrão de resultados permite inferir que há uma delecção superior a 29 Kb.

Na segunda família a pesquisa da IVS22 revelou um padrão electroforético anormal: apenas estava presente a banda correspondente à amplificação dos genes A extragénicos. A possibilidade de se tratar de uma grande delecção levou à amplificação do gene *F8* por PCR, cujos resultados mostraram ausência de amplificação dos exões 21 e 22. Inicialmente considerou-se a hipótese de se tratar de uma delecção de cerca de 40 Kb, mas estudos realizados por MLPA identificaram a presença de parte do exão 21 do gene *F8*. Por PCR foi possível confirmar a presença do STR22 intragénico (região de *Short Tandem Repeat*, repetição GT no intrão 22 do gene *F8* [71]) o que permitiu inferir que esta delecção do *F8* é de aproximadamente 16 Kb.

Tabela XX. Grandes delecções identificadas nas familias com hemofilia A.

Grandes delecções				
n	***Natureza da delecção***	***Domínio***	***Severidade***	***Comentário***
1	c.(6244_?)_(?_6430) Delecção Exão 21(parcial) – Exão 22	C1	Severo	Delecção ~ 16 Kb
1	c.(?_-30)_(387_?) Delecção Promotor – Exão 3	A1	Severo	Delecção > 29 Kb

As mães destes dois indivíduos são portadoras das respectivas delecções (razões controlo/amostra entre 0.47 e 0.66) (Figura 3.5)

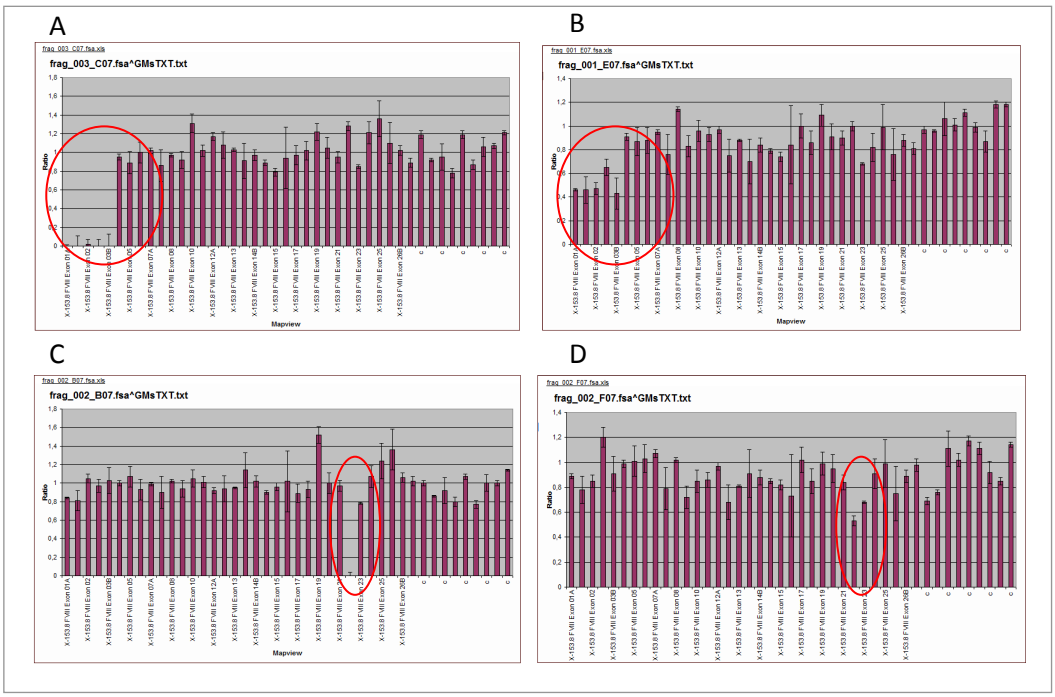

Figura 3.5: Resultados obtidos no Coffalyzer 9.0. A) Confirmação da delecção da Região Promotora–Exão 3 (razão controlo/amostra: 0); B) Estudo de portadora realizado na mãe do indivíduo com a grande delecção da Região promotora–Exão 3 (razão controlo/amostra: 0.48±0.02); C) Confirmação da delecção parcial do Exão 21 e delecção total do Exão 22 (razão controlo/amostra: 0); D) Estudo de portadora realizado na mãe do indivíduo com a grande delecção Exão 21 (parcial)-Exão 22 (razão controlo/amostra: 0.53).

1.8. Duplicação Parcial do gene F8

Num indivíduo com Hemofilia A severa, cuja mutação não havia sido detectada por PCR/Sequenciação nucleotídica directa, foi identificada, por MLPA, a duplicação dos exões 7 ao 22 do gene *F8* (Figura 3.6 A).

O estudo da amostra de ADN de uma prima permitiu identificar esta duplicação parcial em heterozigotia (Figura 3.6 B).

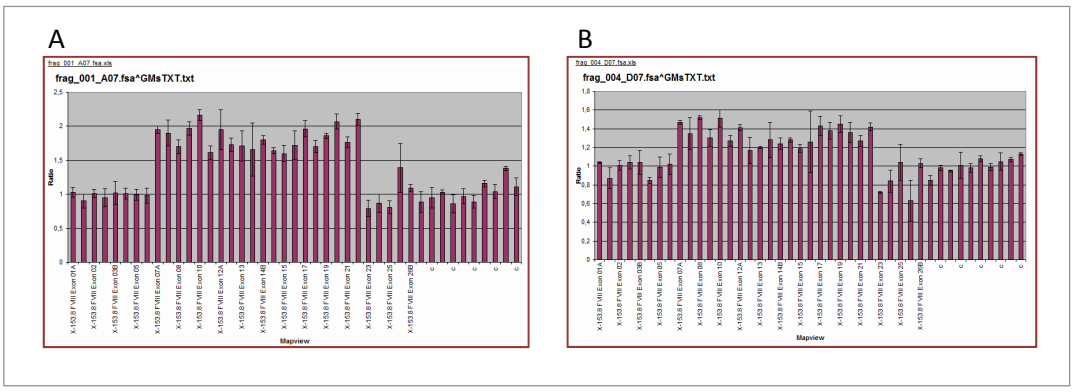

Figura 3.6: **Resultados obtidos no Coffalyzer 9.0**. A) Identificação da duplicação do exão 7 ao exão 22 do gene *F8* (razão controlo/amostra: 1.8±0.5); B) Estudo de portadora realizado na prima do indivíduo com duplicação parcial do gene *F8* (razão controlo/amostra: 1.3±0.2).

2. ESTUDOS DE PORTADORA E DIAGNÓSTICO PRÉNATAL

Foram realizados 129 estudos de portadoras, dos quais 83 revelaram heterozigotia para a mutação do familiar afectado.

Em 33 famílias, não foi possível identificar o padrão de hereditariedade por impossibilidade de estudo de outros familiares. Em 8 de 70 famílias (11%) não foram encontrados outros elementos com as respectivas mutações, o que sugere que se trata de mutações *de novo*.

Foram efectuados 14 diagnósticos prénatais, dos quais 6 revelaram presença de mutação no feto.

3. FACTORES MODULADORES DO FENÓTIPO

Nos 43 doentes com Hemofilia A severa seguidos no Centro de Hemofilia do CHC, 4 apresentaram mutações associadas com Trombofilia: 2 com a variante da Protrombina G20210A (PRT G20210A) em heterozigotia; 1 heterozigotia e 1 homozigotia para a mutação Factor V Leiden (FV Leiden) (Tabela XXI).

Tabela XXI. Fenótipo hemorrágico dos indivíduos Hemofilia A severa e mutações FV Leiden/PRT G20210A

ID	*Mutação*	*FVII:C (%)*	*Trombofilia*	*Frequência episódios hemorrágicos*	*Nº dias exposição ao tratamento/ano*
HM3614HA	c.269 T>C (p.Leu71Pro)	> 1	HMZ FVLeiden	Pouco frequentes	2 a 3 tratamentos/ ano
HM4760HA	IVS22	> 1	HTZ FV Leiden	8 -10 hemorragias/ mês	Muito tratado; > 50 dias
H91919HA*	c. 2945insA (p.AsnfsX22)	> 1	HTZ PRT G20210A	1-2 hemorragias/ mês	Muito tratado; > 50 dias
Açores	IVS22	> 1	HTZ PRT G20210A	4 -5 hemorragias/ mês	Muito tratado; > 50 dias

4. INIBIDORES ESPECÍFICOS PARA O FACTOR VIII

Seis doentes com Hemofilia (5 severos e 1 ligeiro) desenvolveram inibidores específicos para o FVIII. Os 5 hemofílicos severos são hemizigóticos para as mutações IVS22 (n=2), IVS1 (n=2) e grande delecção c.(?_-30)_(387_?) (Região Promotora – Exão 3). Os 3 com a mutação IVS22 são altos respondedores (>10 UB), e os 2 com a IVS1 são baixos respondedores (<10 UB) e pertencem à mesma família.

O Hemofílico A ligeiro que desenvolveu inibidores é portador da mutação p.Gln2246Lys.

5. DISTRIBUIÇÃO DAS MUTAÇÕES POR FENÓTIPO

Os indivíduos com Hemofilia A severa apresentam grande diversidade de tipos de mutações (Figura 3.7). As mais frequentes foram a IVS22 (51%) e pequenas delecções/inserções (25%).

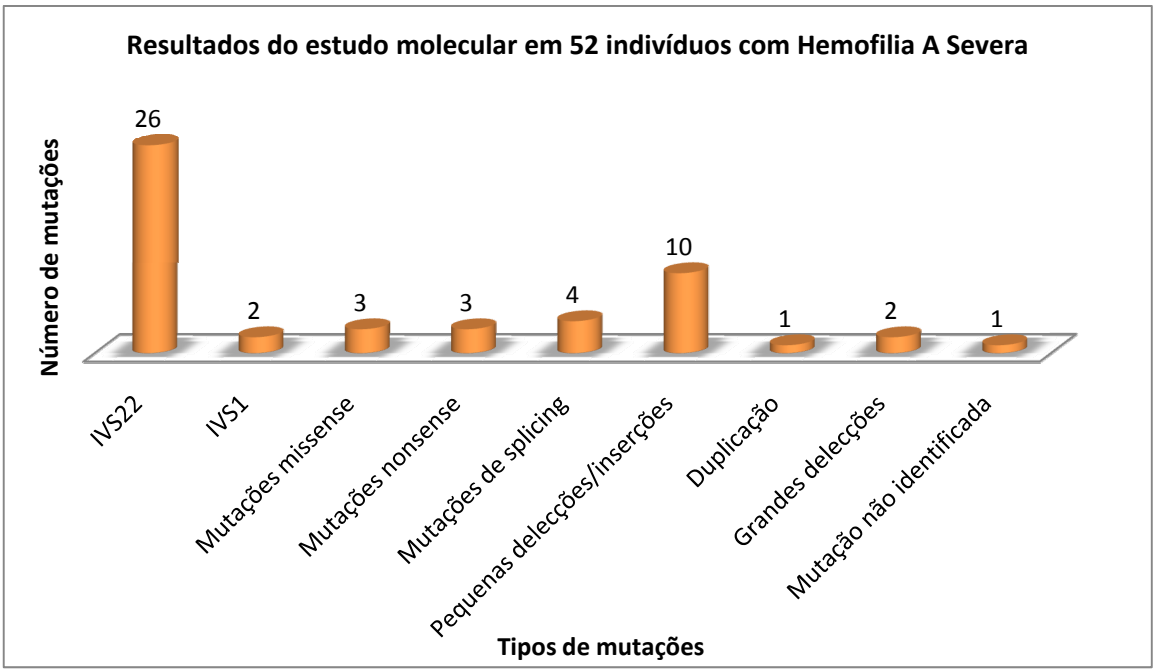

Figura 3.7: Representação gráfica da distribuição dos resultados do estudo molecular realizado no grupo de indivíduos com Hemofilia A severa.

Relativamente à distribuição dos tipos de mutação por fenótipo, as mutações *missense* são as mais frequente (49%), e são maioritariamente associadas aos fenótipos ligeiro e moderado (Figura 3.8).

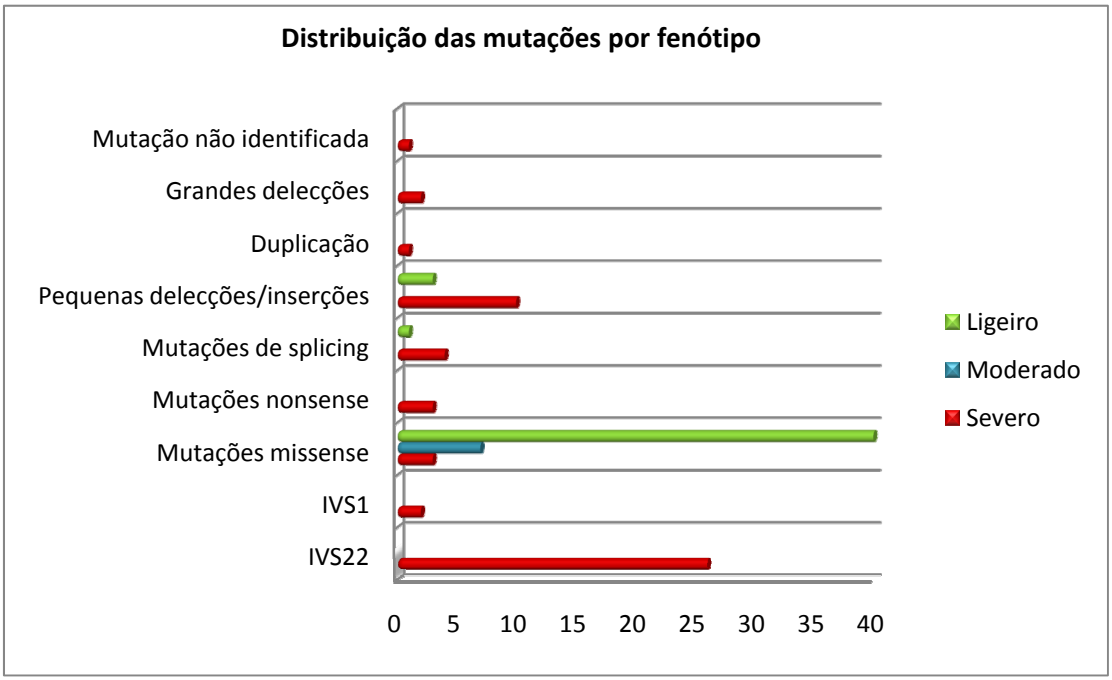

Figura 3.8: Representação gráfica da distribuição das mutações identificadas por fenótipo.

6. ESTRATÉGIA DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE HEMOFILIA A - ALGORITMO DE ESTUDO

Com este estudo definiu-se o algoritmo de estudos dos indivíduos com HA seguidos e referidos ao Centro de Hemofilia do CHC tendo como orientação a sua severidade.

Nos casos de HA severa, a pesquisa da IVS22 por PCR Longo é feita como pesquisa de primeira linha, uma vez que este rearranjo é causa de severidade em cerca de metade dos casos. Não sendo detectada esta mutação, é estudada a IVS1 do gene *F8*. Não tendo sido detectado nenhum dos rearranjos anteriores, procede-se à amplificação da região promotora, dos exões e regiões intrónicas flanqueantes do gene *F8* e sequenciação nucleotídica directa dos produtos de PCR obtidos.

Nos casos de HA moderada e ligeira, a estratégia adoptada é directamente a amplificação do gene *F8* e sequenciação directa dos produtos de PCR obtidos. Nestes indivíduos exclui-se previamente uma possível DvW tipo 2N, procedendo-se à amplificação e sequenciação nucleotídica directa dos exões 18 a 27 do gene FvW, que codificam os domínios D3-D', local de ligação do FvW ao FVIII [76] (Figura 3.9).

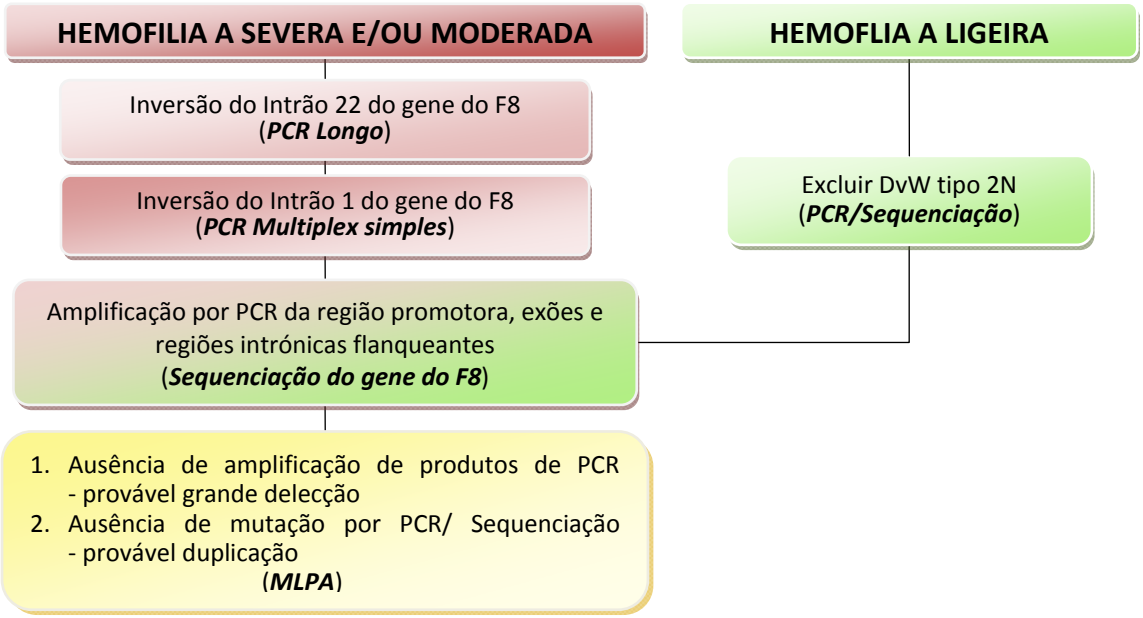

Figura 3.9: Algoritmo para estudo molecular de Hemofilia A

Capítulo IV

DISCUSSÃO

IV. DISCUSSÃO

A Hemofilia A é causada por defeitos qualitativos ou quantitativos do factor VIII (FVIII), originando uma coagulopatia hemorrágica recessiva de transmissão ligada ao cromossoma X. A patologia afecta, aproximadamente, 1 em cada 5000 indivíduos do sexo masculino [1] e, muito raramente, mulheres [2, 3]. Não afecta nenhuma etnia, nem região geográfica em particular [82].

O Centro de Hemofilia do CHC, E.P.E. é o local de estudo de Hemofilia A na região Centro. Integra o Laboratório de Hemostase e de Biologia Molecular onde foi realizado o diagnóstico e caracterização dos doentes e estudos familiares. O estudo de portadoras, aconselhamento genético e, quando solicitados, os DPN foram feitos em colaboração com a Unidade de Diagnóstico Prénatal (DPN) da Maternidade Bissaya Barreto e outros Centros de DPN.

O estudo apresentado teve como objectivo identificar as mutações no gene *F8* de 141 hemofílicos A, pertencentes a 103 famílias, seguidos ou referidos ao Centro de Hemofilia do CHC, E.P.E.. Com base nos dados obtidos, foi feita a correlação entre as alterações moleculares encontradas e a severidade das manifestações hemorrágicas e foram investigados factores moduladores do fenótipo nos Hemofílicos severos. A frequência relativa das diferentes mutações identificadas em cada um dos grupos de Hemofílicos – severos, moderados e ligeiros – serviu de base à revisão da estratégia de investigação de doentes e portadoras. A metodologia implementada foi crucial para o diagnóstico prénatal através do estudo do ADN extraído directamente de amostras de líquido amniótico.

A distribuição das famílias por severidade do fenótipo: 50% (52/103) com Hemofilia A severa, 7% (7/103) moderada e 43% (44/103) ligeira, está de acordo

com outros estudos [31, 35, 39, 65] que referem que cerca de metade dos indivíduos identificados têm fenótipo severo.

Nas 103 famílias estudadas foram identificadas 46 mutações distintas, que incluem 24 mutações *missense*, 3 mutações *nonsense*, 5 mutações de *splicing*, 5 pequenas delecções, 4 pequenas inserções, 2 grandes delecções, 1 duplicação parcial do gene, a inversão do intrão 22 (IVS22) e a inversão do intrão 1 (IVS1).

Estudos de familiares dos doentes com Hemofilia A severa identificaram 83 portadoras e permitiram o diagnóstico prénatal que foi solicitado em 14 gestações.

Nas 103 famílias com Hemofilia A foram identificadas 23 mutações não previamente descritas (22%), uma percentagem semelhante às de outros estudos publicados [83]. Estes dados confirmam a heterogeneidade das alterações moleculares na Hemofilia A [84].

1. NOVAS MUTAÇÕES

Os défices de FVIII:C podem resultar de ausência ou diminuição da síntese da proteína, défice quantitativo, ou da diminuição da sua secreção, défice qualitativo. Os défices qualitativos são identificados como *Cross-Reacting Material* (CRM) positivos, porque apresentam FVIII:C disfuncional no plasma, os défices quantitativos, CRM negativos e CRM reduzidos. A distinção entre estes mecanismos patológicos é efectuada pela relação entre a actividade da proteína (FVIII:C) e os níveis plasmáticos de antigénio (FVIII:Ag).

A quantificação dos níveis de FVIII:C e de FVIII:Ag nos doentes portadores de novas mutações permitiu concluir que se trata de fenótipos CRM negativos e CRM reduzidos, o que corresponde a défices quantitativos.

A maioria destas novas mutações são *missense* (48%) e ocorreram todas em aminoácidos conservados ao longo das espécies (*Sus scrofa, Mus musculus, Rattus norvegicus* e *Canis familiaris*), excepto a mutação p.Val601Met. Esta mutação não consta da lista de polimorfismos publicada e, embora não tenham sido encontradas outras mutações no gene *F8* que justifiquem o défice de FVIII (27%), está em curso a sua pesquisa em amostras de indivíduos normais.

Estas mutações *missense* foram classificadas como "*Probably damaging*" (n=6), "*Possibly damaging*" (n=2), e "*Bening*" (n=3) no programa *PolyPhen*, que avalia o impacto das trocas de aminoácidos na estrutura da proteína.

Das 3 novas mutações de *splicing*, 2 são em locais aceitador com perda de *splicing* e 1 é em local dador, levando à criação de um local de *splicing* alternativo. Esta última, ao contrário do esperado, foi identificada num doente com fenótipo ligeiro (FVIII:C 12%).

Todas as outras mutações descritas neste trabalho pela primeira vez estão associadas a fenótipos severos, excepto a delecção do codão 1969 em 2 doentes com fenótipo ligeiro.

2. INVERSÃO DO INTRÃO 22 E INVERSÃO DO INTRÃO 1

A inversão do intrão 22, descrita pela primeira vez em 1993 [85] como a mutação mais frequente entre os Hemofílicos severos, foi identificada neste estudo em 26/52 famílias (51%). A inversão do intrão 1 foi encontrada apenas em 2/52 famílias. Estes dois rearranjos foram responsáveis por 54% dos casos de Hemofilia A severa [45, 49].

Quatro dos 5 HA severos que produziram inibidores, 2 têm IVS22 e 2 têm IVS1.

3. MUTAÇÕES PONTUAIS – MUTAÇÕES *MISSENSE*

Foram identificadas 50 mutações *missense*, a grande maioria (94% - 47/50) em associação com fenótipos ligeiro e moderado. A alteração proteica resultante deste tipo de mutações, que é depende da localização e da natureza do aminoácido substituído, vai condicionar a quantidade de FVIII produzida e a clínica hemorrágica do doente.

Os domínios A (A1, A2 e A3) formam entre si uma estrutura triangular e estão envolvidos na estabilização da cadeia pesada (A1-A2) e leve (A3-C1-C2) através de numerosas interacções entre aminoácidos nas zonas hidrofóbicas e na região de interface dos domínios A [86]. Estas interacções são cruciais para a estabilidade de ambas as cadeias que não estão ligadas entre si de forma covalente [29, 86].

Apenas 3 das mutações *missense* (p.Leu71Pro, p.Tyr1890Cys e p.Gly1923Arg), afectando os domínios A1 e A3, estão associadas a fenótipos severos. Esta severidade poderá ser explicada pelo facto dos dois domínios serem cruciais para a estabilidade termodinâmica do FVIII [29, 86]. O domínio A3 está também envolvido na interacção com o FIXa, servindo de receptor desta enzima. Mutações neste domínio podem também perturbar a ligação do co-factor ao seu substrato, comprometendo o funcionamento do complexo Tenase [21, 26].

As substituições de aminoácidos no domínio A2 podem afectar, por um lado, resíduos que estejam em contacto com o domínio catalítico do FIXa e, por outro lado, resíduos mais distantes que podem estabelecer ligações entre si e promover alteração conformacional do FVIII [26, 29]. Foram identificadas mutações neste domínio em famílias com hemofilia moderada a ligeira (n=16).

O domínio C2 está directamente envolvido nas ligações ao FvW e aos fosfolípidos da membrana da plaqueta [1, 29]. As mutações que ocorram neste

domínio comprometem a ligação do FVIII ao seu transportador proteico e a formação do complexo “tenase”. O resultado é a redução da semi-vida do FVIII e produção de fenótipo moderado a ligeiro [26].

A mutação p.Gln2189Glu, localizada no domínio C2, foi identificada em 15/50 famílias (30%) com Hemofilia A ligeira, um número superior ao descrito por outros autores (*HAMSTeRS*). Aparentemente, estes indivíduos não são relacionados; seria interessante estudar o haplótipo associado a esta mutação, para verificar se a sua frequência elevada é devida a um efeito fundador.

A maioria das mutações *missense* identificadas afectam os domínios A2 (n=16) e C2 (n=21) do FVIII.

Não foram identificadas mutações *missense* no domínio B, à semelhança do descrito por outros autores. O domínio B, codificado pelo exão 14, é o mais extenso e tem uma função importante na biossíntese do FVIII porque possui locais de glicosilação [21] necessários no transporte intracelular [87].

4. MUTAÇÕES PONTUAIS – MUTAÇÕES *NONSENSE*

Em 3 doentes com fenótipo severo foram identificadas mutações *nonsense*, 2 das quais descritas pela primeira vez (p.Ser170X e p.Gln783X). A substituição nucleotídica resulta num codão de terminação prematuro que pode dar origem a uma proteína truncada ou a um ARNm instável que não é traduzido. As mães e outros elementos femininos das duas famílias são heterozigóticas.

5. MUTAÇÕES PONTUAIS – MUTAÇÕES DE *SPLICING*

As mutações de *splicing* foram identificadas em 5% das 103 famílias estudadas. Três das mutações são descritas pela primeira vez: c.1010-2 A>C (IVS7-2 A>C), c.2114-1 G>T (Ex14-1 G>T) e c.6900+1 G>C (IVS25+1 G>C) e ocorreram nos dinucleótidos de consenso do local de *splicing*. Era esperado que todas estas mutações estivessem associadas a fenótipos severos, uma vez que a alteração no processo de *splicing* [88] dá origem a um ARNm anormal. No entanto, o indivíduo hemizigótico para a mutação IVS25+1 G>C, num local dador de *splicing,* tem um fenótipo ligeiro. A avaliação do efeito desta mutação, realizada através do programa *Human Splicing Finder*, mostrou que leva à criação de um novo local de *splicing* no exão 25, 4 nucleótidos a 5' do local esperado. Esta alteração vai comprometer os 2 aminoácidos terminais do Exão 25 e produzir um codão de terminação 14 codões depois do novo local de *splicing*. O Exão 26 é constituído por 1953 nucleótidos (Vega Genome Browser –http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons), mas apenas 156 são traduzidos. O aparecimento do codão de terminação impede a transcripção de 37 codões na extremidade do domínio C2.

As outras 4 mutações, 2 em locais aceitadores e 2 em locais dadores de *splicing*, levam à formação de codões de terminação precoces e estão associadas a fenótipos severos.

6. PEQUENAS DELECÇÕES E INSERÇÕES

A inserção ou remoção de um ou mais nucleótidos causa uma mudança no quadro de leitura da sequência nucleotídica, levando à alteração dos codões subsequentes e ao aparecimento de um codão de terminação prematuro. Oito das 10 mutações identificadas são responsáveis por fenótipos severos.

Foram identificadas 4 novas mutações: 1 pequena inserção, c.129insT (p.Leu24fsX14) e 3 pequenas delecções, c.2826_2831delAA (p.Lys925fsX6), c. 2563dup13bp (p.836ThrfsX2) e c.5962_5964delGAG (p.1696delGAG). A delecção do codão 1969 GAG, que não interfere com o quadro de leitura, foi identificada em 2 doentes com fenótipo ligeiro, o que sugere que o ácido glutâmico 1969 não tem um papel primordial na estrutura da proteína FVIII.

Num outro indivíduo com fenótipo ligeiro (FVIII:C=19%), foi identificada a delecção de uma adenina no exão 14 (c.3637delA p.1194fsX4), que ocorre numa sequência de 9 Adeninas. O mecanismo que faz com que haja produção de uma quantidade apreciável de FVIII (FVIII:C 15%), ao contrário do que seria esperado, poderá estar relacionado com a correcção da mutação por equívoco da enzima [89, 90] ou a pela presença de mosaicismo [91]. Todos os estudos efectuados no ADN genómico de sangue periférico total, ADNc de linfócitos do sangue periférico e ADN de células da mucosa bucal mostraram uma sequência de nucleótidos com a mutação em paralelo com uma sequência de menor intensidade, aparentemente normal. Estes dados permitem concluir pela presença de mosaicismo [91].

7. GRANDES DELECÇÕES E DUPLICAÇÃO PARCIAL DO GENE *F8*

A identificação de grandes delecções num gene tão extenso como o FVIII reveste-se de inúmeras dificuldades e só recentemente, utilizando a técnica de MLPA, foi possível identificar estas delecções.

Duas grandes delecções e uma duplicação parcial do gene *F8* foram identificadas em 3 famílias com fenótipo severo (6%). Segundo a literatura, as grandes delecções são responsáveis por 5% dos casos de Hemofilia A severa [72, 82] e as duplicações parciais do gene são eventos muito raros [74].

As delecções foram confirmadas por MLPA e as suas dimensões aproximadas foram calculadas: a delecção Região Promotora-Exão 3 é superior a ≈29 Kb e a delecção Exão 21 (parcial) -Exão 22 é de ≈16 Kb. Na grande delecção Região Promotora–Exão 3, a ausência de Região Promotora impede a transcrição do gene *F8*; na delecção Exão 21 (parcial)-Exão 22, a ausência de parte do exão 21 e a ausência total do exão 22, compromete a síntese do domínio C1 do FVIII, impedindo sua a actividade procoagulante.

A identificação da duplicação parcial do gene *F8*, mutação não detectável com a metodologia PCR/Sequenciação nucleotídica directa, foi conseguida através da técnica de MLPA e apresenta uma dimensão de aproximadamente 73,4 Kb.

A presença do alelo normal nas mulheres portadoras de grandes delecções ou duplicações parciais do gene *F8* inviabiliza a sua identificação por técnicas de PCR/Sequenciação nucleotídica directa. Com a técnica de MLPA quantitativo foi possível identificar 3 portadoras: as mães dos doentes com grandes delecções e uma prima materna do indivíduo com duplicação parcial do gene *F8*.

A técnica de MLPA é simples e robusta e tornou possível o diagnóstico prénatal nestas famílias.

8. MODULAÇÃO DO FENÓTIPO

A mutação FV Leiden e variante da PRT G20210A são mutações que conferem um ganho de função produzindo um estado ligeiro de hipercoagulabilidade [53, 92-94]. O FV Leiden (p.Arg506Gln) confere resistência à proteína C activada por supressão de um local de inactivação; a variante da protrombina está associada a níveis mais elevados de FII. São considerados factores de risco para trombose

venosa e apresentam prevalências alélicas na população em geral de 2-7% e 1-2%, respectivamente [92, 95].

Nos 4 doentes com Hemofilia A severa a presença, em heterozigotia, das mutações PRT G20210A ou FV Leiden, aparentemente não contribui para a modulação do fenótipo: a frequência de episódios hemorrágicos e do tratamento substitutivo são semelhantes. No entanto, o Hemofílico A com a mutação p.Leu71Pro no gene *F8* (FVIII:C inferior a 1%) e homozigotia para o FV Leiden, comporta-se clinicamente como um hemofílico moderado/ligeiro: necessita apenas de 2 a 3 tratamentos por ano e os episódios hemorrágicos são geralmente traumáticos.

9. INIBIDORES

O desenvolvimento de inibidores é uma complicação do tratamento dos Hemofílicos e acontece mais frequentemente em associação com inversões e grandes delecções do gene *F8* em que há ausência total de proteína circulante [57].

Cinco dos 6 HA que desenvolveram inibidores são severos e portadores das mutações IVS22 (n=2), IVS1 (n=2) e grande delecção Região Promotora-Exão 3 (n=1).

Um Hemofílico A ligeiro com a mutação p.Gln2246Lys também desenvolveu inibidores após tratamento intensivo para cirurgia *major*. Esta mutação está localizada perto de um importante determinante antigénico do epítopo inibitório no domínio C2 do FVIII [29, 96, 97], um dos alvos preferenciais de inibidores específicos para o FVIII. A troca de uma Glutamina por uma Lisina no codão 2246 vai provocar alteração de hidrofobicidade e carga num local interno da proteína de

que resulta o rompimento de ligações estruturais e alteração conformacional da [29, 79, 98].

10. AUSÊNCIA DE MUTAÇÕES NO GENE *F8*

Num indivíduo Africano com Hemofilia A severa, não foi identificada qualquer alteração no gene *F8*. Neste caso as mutações podem ocorrer nas regiões intrónicas, em regiões de controlo do gene *F8* (*locus-controlling regions*) ou em regiões externas ao gene mas que são importantes para a sua expressão. O estudo do ARNm pode contribuir para a elucidação deste caso [99, 100].

Capítulo V

CONCLUS%h

V. CONCLUSÃO

O estudo da hemofilia A, devido às grandes dimensões do gene *F8*, tem sido um desafio pela sua complexidade e morosidade. Esta abordagem metodológica agilizou este estudo tornando-o simples e bastante mais rápido, o que é vantajoso para a realização de diagnóstico prénatal em tempo útil.

A implementação da técnica MPLA, na detecção das grandes delecções e duplicações, veio resolver uma limitação da metodologia PCR/Sequenciação e permitiu a identificação de portadoras com este tipo de mutações.

Foram caracterizadas as alterações moleculares em 102 das 103 famílias não relacionadas envolvidas neste estudo (99%). O tipo e frequência das alterações identificadas são muito semelhantes ao descrito por outros autores.

Foram ilustrados os potenciais efeitos induzidos por 23 novas mutações através de modulação molecular e correlação genótipo-fenótipo.

O fenótipo severo encontra-se, na sua grande maioria, relacionado com os rearranjos Inversão do intrão 22 e Inversão do intrão 1 (28/52). As 11 *frameshifts* identificadas são responsáveis pela formação de codões de terminação. A excepção é a delecção c.3637delA (p.1194*fs*X4) associada a fenótipo ligeiro, possivelmente devido a fenómeno de mosaicismo [91]. Com a implementação da técnica de MLPA, foi possível, não só confirmar as grandes delecções encontradas, como identificar uma duplicação parcial do gene *F8* e cobrir uma lacuna que foi o estudo de portadoras nestas famílias.

Os fenótipos moderados e ligeiros foram devidos a mutações *missense* de transição em cerca de 62% das famílias.

Estudaram-se 129 mulheres para a mutação do respectivo familiar afectado, revelando-se 83 heterozigóticas para a mutação. Nos 14 diagnósticos prénatais efectuados, 6 revelaram presença de mutação em hemizigotia.

A associação de Hemofilia A severa e homozigotia para a mutação FV Leiden resultou, num indivíduo portador da mutação p.Leu71Pro com níveis de actividade de FVIII:C inferiores a 1%, na melhoria da expressão clínica da patologia hemorrágica, com necessidade apenas de 2 a 3 tratamentos substitutivos por ano.

Os inibidores detectados estão associados à IVS22, à IVS1 e à grande delecção da Região Promotora – Exão 3. O hemofílico com fenótipo ligeiro que desenvolveu inibidores após tratamento para cirurgia *major*, é portador de uma mutação *missense* localizada perto do epítopo inibitório no domínio C2 do FVIII [29, 96, 97].

A avaliação do genótipo/fenótipo poderá ser complementada com o estudo das mutações *versus* a modulação estrutural da proteína o que contribuirá para uma melhor caracterização funcional das variantes do FVIII e, subsequentemente, compreensão da relação estrutura-função da proteína e avaliação do efeito de algumas variantes na produção do fenótipo hemofilia.

Este estudo permitiu rever e definir uma estratégia de diagnóstico que originou a implementação de um algoritmo de investigação de doentes e portadoras de Hemofilia A.

Capítulo VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 Oldenburg J, Ananyeva NM, Saenko EL. Molecular basis of haemophilia A. *Haemophilia*. 2004; **10**: 133-9.

2 Valleix S, Vinciguerra C, Lavergne J-M, Leuer M, Delpech M, Negrier C. Skewed X-chromosome inactivation in monochorionic diamniotic twin sisters results in severe and mild hemophilia A. *Blood*. 2002.

3 Seeler RA, Vnencak-Jones CL, Bassett LM, Gilbert JB, Michaelis RC. Severe haemophilia A in a female: a compound heterozygote with nonrandom X-inactivation. *Haemophilia*. 1999; **5**: 445-9. 10.1046/j.1365-2516.1999.00352.x

4 Mann KG, Nesheim ME, Church WR, Haley P, Krishnaswamy S. Surface-Dependent Reactions of the Vitamin K-Dependent Enzyme Complexes. *Blood*. 1990; **76**: 1-16.

5 Hoffbrand AV, Petit JE. *Essential Haematology*. Blackwell Science, 1993.

6 Dahlbäck B. Blood coagulation. *The Lancet*. 2000; **355**: 1627-32.

7 High KA, Roberts HR. *Molecular Basis of Thrombosis and Haemostasis*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1995.

8 Spronk HM, Govers-Riemslag JW, ten Cate H. The blood coagulation system as a molecular machine. *Bioessays*. 2003; **25**: 1220-8.

9 Fidalgo T. Factores de risco genético para doença tromboembólica - Factor V Leiden, Metilenotetrahidrofolato redutase C677T e variante da Protrombina G20210A. *Faculdade de Ciências e Tecnologia*. Coimbra: Universidade de Coimbra, 1998.

10 Schmaier AH. Pasma kallicrein/kinin system: a revised hipothesis for its activation and its physiologic contributions *Current Opinion in Hematology*. 2000; **7**: 261-5.

11 Furie B, Furie BC. Molecular basis of blood coagulation. *Hematology Basic Principles and Practice*, 3rd edn. New York: Churchill Linvingstone, 1998, 1783-804.

12 McKenna R. Factor VIII. *eMedicine*, 2003.

13 Hoffman M, Monroe III DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*. 2001; **85**: 958-65.

14 Hoffman M. Remodeling the blood coagulation cascade. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 2004; **16**: 17-20.

15 Girma J-P, Fressinaud E, Houllier A, Laurian Y, Amiral J, Meyer D. Assay of factor VIII antigen (VIII:CAg) in 294 haemophilia A patients by a new commercial ELISA using monoclonal antibodies. *Haemophilia*. 1998; **4**: 98-103.

16 Lenting PJ, van Schooten CJM, Denis CV. Clearance mechanisms of von Willebrand factor and factor VIII. *J Thromb Haemost* 2007; **5**: 1353-60. 10.1111/j.1538-7836.2007.02572.x

17 Vlot AJ, Koppelman SJ, Bouma BN, Sixma JJ. Factor VIII and von Willebrand Factor. *Thromb Haemost*. 1998; **79**: 456-65.

18 Federici AB. The factor VIII/ von Willebrand factor complex: basic and clinical issues. *Haematologica*. 2003; **88**: 3-12.

19 Favaloro EJ, Kershaw G, Bukuya M, Hertzberg M, Koutts J. Laboratory diagnosis of von Willebrand disorder (vWD) and monitoring of DDAVP therapy: efficacy of the PFA-100® and vWF:CBA as combined diagnostic strategies *Haemophilia*. 2001; **7**: 180-9.

20 Evans DIK. Twenty-one years of haemophilia. *Haemophilia*. 1997; **3**: 17-39.

21 Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. The Life Cycle of Coagulation Factor VIII in View of Its Structure and Function *Blood*. 1998; **92**: 3983-96

22 Sadler JE, Budde U, Eikenboom JCJ, Favaloro EJ, Hill FGH, Holmberg L, Ingerslev J, Lee CA, Lillicrap D, Mannucci PM, Mazurier C, Meyer D, Nichols WL, Nishino M, Peake IR, Rodeghiero F, Schneppenheim R, Ruggeri ZM, Srivastava A, Montgomery RR, Federici AB. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. . *J Thromb Haemost*. 2006; **4**: 2103-14.

23 Budde U, Schneppenheim R. von Willebrand factor and von Willebrand disease. *Rev Clin Exp Hematol*. 2001; **5**: 335-68.

24 Mazurier C, Parquet-Gernez A, Gaucher C, Lavergne J-M. Factor VIII deficiency not induced by FVIII gene mutation in a female first cousin of two brothers with haemophilia A. *British Journal of Haematology*. 2002; **119**: 390-2.

25 Vehar GA, Keyt B, Eaton D, Rodriguez H, O'Brien DP, Rotblat F, Oppermann H, Keck R, Wood WI, Harkins RN. Structure of human factor VIII. *Nature*. 1984; **312**: 337-42.

26 Habart D. The molecular pathogenesis of hemophilia A. *Čas Lék Čes*. 2005; **144**: 727-32.

27 Saenko EL, Ananyeva NM, Tuddenham EGD, Kemball-Cook G. Factor VIII - novel insights into form and function. *Br J Haematol*. 2002; **119**: 323-31.

28 Saenko EL, Shima M, Sarafanov AG. Role of Activation of the Coagulation Factor VIII in Interaction with vWf, Phospholipid, and Functioning within the Factor Xase Complex. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 1999; **9**: 185-92.

29 Fay PJ, Jenkins PV. Mutating factor VIII: lessons from structure to function. *Blood Reviews*. 2005; **19**: 15-27.

30 Oldenburg J. Lessons learned from the analysis of mutations in Haemophilia A. *Current Issues in Transfusion Medicine (Workshop)*. Budapest, 2002.

31 Bolton-Maggs PH, Pasi KJ. Haemophilias A and B. *The Lancet*. 2001; **361**: 1801-9.

32 Jacquemin M, Neyrinck A, Hermanns MI, Lavend'homme R, Rega F, Saint-Remy J-M, Peerlinck K, Van Raemdonck D, Kirkpatrick CJ. FVIII production by human lung microvascular endothelial cells. *Blood*. 2006; **108**: 515-7.

33 Roberts HR, Monroe III DM, Hoffman M. Molecular biology and biochemistry of th coagulation factors and pathways of hemostasis. In: al. BEe, ed. *Williams Hematology*, 6th edn: McGraw-Hill, 2001.

34 Hansson K, Stenflo J. Post-translational modifications in proteins involved in blood coagulation *J Thromb Haemost*. 2005; **3**: 2633-48.

35 Graw J, Brackmann H-H, Oldenburg J, Schneppenheim R, Spannagl M, Schwaab R. Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nature Reviews Genetics*. 2005; **6**: 488-501.

36 Mannucci PM, Tuddennham EGD. The Hemophilias - From Royal Genes to Gene Therapy. *N Engl J Med*. 2001; **344**: 1773-9.

37 Hoyer LM. Hemophilia A. *New England Journal of Medicine*. 1994; **330**: 38-47.

38 Mannucci PM, Tuddenham EGD. The Hemophilias: Progress and Problems. *Seminars in Hematology*. 1999; **36**: 104-17.

39 Kemball-Cook G, Tuddenham EGD, Wacey AI. The factor VIII Structure and Mutation Resource Site: HAMSTeRS version 4. *Nucleic Acids Research*. 1998; **26**: 216-9.

40 White GC, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J. Definitions in Hemophilia. Factor VIII and Factor IX Subcommittee. 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; **85**: 560.

41 Favier R, Lavergne J-M, Costa J-M, Caron C, Mazurier C. Unbalanced X-chromossome inactivation with a novel FVIII gene mutation resulting in severe hemophilia A in a female. *Blood*. 2000; **96**: 4373-5.

42 Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature*. 1984; **312**: 326-30. 10.1038/312326a0.

43 Gallardo D, Vidal F, Altisent C. Diagnóstico molecular. Estudio de portadoras y consejo genético. In: Fonrodona JB, Hernando ER, eds. *Guía Práctica de Coagulopaías Congénitas*. Madrid: Acción Médica, 2001.

44 Naylor J, Buck D, Green PM, Williamson H, Bentley D, Giannelli F. Investigation of the FVIII intron 22 related region (int22h) and the associated inversion junctions. *Human Molecular Genetics*. 1995; **4**: 1217-24.

45 Lakich D, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet* 1993; **5**: 236-41.

46 Freije D, Schlessinger D. A 1.6-Mb contig of yeast artificial chromosomes around the human factor VIII gene reveals three regions homologous to probes for the DXS115 locus and two for the DXYS64 locus. *Am J Hum Genet*. 1992; **51**: 66–80.

47 Brasi CD, Slavutsky IR, Larripa IB. Genetica Molecular de la Hemofilia A. *Medicina*. 1996; **56**.

48 Rossiter JP, Young M, Kimberland ML, Hutter P, Ketterling RP, Gitschier J, Horst J, Morris MA, Schaid DJ, Moerloose P, Sommer SS, Kazazian HH, Antonarakis SE. Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. *Hum Mol Genet*. 1994; **3**: 1035-9.

49 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

50 Mannucci PM. Hemophilia and related bleeding disorders: a story of dismay and success. *Hematology*. 1998; **4**: 1-11.

51 Lee CA, Berntorp EE, Hoots WK, eds. *Textbook of Hemophilia*. Blackwell Publishing: Massachussets, 2006.

52 Dargaud Y, Meunier S, Negrier C. Haemophilia and thrombophilia: an unexpected association! *Haemophilia*. 2004; **10**: 319-26.

53 Visser MCH, Rosendaal FR, Bertina RM. A Reduced Sensitivity for Activated Protein C in the Absence of Factor V Leiden Increases the Risk of Venous Thrombosis *Blood*. 1999; **93**: 1271-6.

54 Lollar P. Pathogenic antibodies to coagulation factors. Part one: FVIII and Factor IX. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2004; **2**: 1082-95.

55 Dacie JV, Lewis SM. *Practical Haematology*. Churchill Livingstone, 2006.

56 Schwaab R, Brackmann HH, Meyer C, Seehafer J, Kirchgesser M, Haack A, Olek K, Tuddenham EGD, Oldenburg J. Haemophilia A: mutation type determines the risk of inhibitor formation. *Thromb Haemost*. 1995; **74**: 1402-6.

57 Oldenburg J, Schröder J, Brackmann HH, Müller-Reible C, Schwaab R, Tuddenham E. Environmental and genetic factors influencing inhibitor development. *Semin Hematol*. 2004; **2004**: 82-8.

58 Lavigne-Lissalde G, Schved JF, Granier C, Villard S. Anti-factor VIII antibodies. A 2005 update. *J Thromb Haemost*. 2005; **94**: 760-9.

59 Habart D. Molecular diagnosis of haemophilia A in clinical practice. *Cas Lek Cesk*. 2005; **144**: 795-800.

60 Dacie JV, Lewis SM. *Practical Haematology*. Churchill Livingstone, 1994.

61 Lygo JE, Johnson PE, Holdaway DJ, Woodroffe S, Whitaker JP, Clayton TM, Kimpton CP, Gill P. The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic casework. *Int J Legal Med*. 1994; **107**: 77-89.

62 Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den BM, Mauser-Bunschoten E. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for FVIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. *Thromb Haemost*. 1995; **73**: 247-51.

63 Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting ADN from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988; **16**: 1215.

64 Brown TA. *Gene Cloning - An Introduction*. UK: Chapman & Hall, 1995.

65 Liu Q, Nozari G, Sommer SS. Single-Tube Polymerase Chain Reaction for Rapid Diagnosis of the Inversion Hotspot of Mutation in Hemophilia A. *Blood*. 1998; **92**: 1458-9

66 Liu Q, Sommer SS. Subcycling-PCR for multiplex long-distance amplification of regions with high and low GC content: application to the inversion hotspot in the factor VIII gene. *Biotechniques*. 1998; **25**: 1022-8.

67 Vidal F, Farssac 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.

68 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*. 1977; **74**: 5463-7.

69 Wood WI, Capon DJ, Simonsen CC, Eaton DL, Gitschier J, Keyt B, Seeburg PH, Smith DH, Hollingshead P, Wion KL, Delwart E, Tuddenham EGD, Vehar GA, Lawn RM. Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature*. 1984; **312**: 330 - 7 10.1038/312330a0.

70 Peake I, Tuddenham EGD. A standard nomenclature for factor VIII and factor IX gene mutations and associated amino acid alterations. On behalf of the ISTH SSC Subcommittee on Factor VIII and Factor IX. *Thromb Haemost*. 1994; **72**: 475-6.

71 Sánchez-Garcia JF, Gallardo D, Ramírez L, Vidal F. Multiplex fluorescent analysis of four short tandem repeats for rapid haemophilia A molecular diagnosis. *Thromb Haemost*. 2005; **94**: 1099-103.

72 Lannoy N, Abinet I, Dahan K, C H. Identification of de novo deletion in the factor VIII gene by MLPA technique in two girls with isolated factor VIII deficiency. *Haemophilia*. 2009; **15**: 797-801.

73 Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res Jun ;*. 2002; **30**: 1-13 (e57).

74 Rost S, Löffler S, Pavlova A, Müller CR, Oldenburg J. Detection of large duplications within the factor VIII gene by MLPA. *J Thromb Haemost* 2008; **6**: 1996-9.

75 Hessner MJ, Luhm RA, Pearson SL, Endean DJ, Friedman KD, Montgomery RR. Prevalence of prothrombin G20210A, factor V G1691A (Leiden), and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T in seven different populations determined by multiplex allele-specific PCR. *Thromb Haemost*. 1999; **81**: 733-8.

76 Mazurier C, Dieval J, Jorieux S, Delobel J, Goudemand M. A new von Willebrand factor (vWF) defect in a patient with factor VIII (FVIII) deficiency but with normal levels and multimeric patterns of both plasma and platelet vWF. Characterization of abnormal vWF/FVIII interaction *Blood*. 1990; **75**: 20-6.

77 Schneppenheim R, Brassard J, Krey S, Budde U , Kunicki TJ, Holmberg L, Ware J, Ruggeri ZM. Defective dimerization of von Willebrand factor subunits due to a Cys3Arg mutation in type IID von Willebrand disease. *Proc Natl Acad Sci*. 1996; **93**: 3581-6.

78 Vinciguerra C, Zawadzki C, Dargaud Y, Pernod G, Berger C, Nougier C, Négrier C. Characterisation of 96 mutations in 128 unrelated severe haemophilia A patients from France. Description of 62 novel mutations. *Thromb Haemost* 2006; **95**: 593-9

79 Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human nonsynonymous SNPs: server and survey. . *Nucleic Acids Res* 2002; **30**: 3894-900.

80 Rebbeck TR, Spitz M, Wu X. Assessing the function of genetic variants in candidate gene association studies. . *Nat Rev Genet*. 2004; **5**: 589-97.

81 Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Béroud G, Claustres M, Béroud C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res May;(): Epub 2009 Apr 1*. 2009; **37**: 1-14 (e67).

82 Bolton-Maggs PH, Pasi KJ. Haemophilias A and B. *The Lancet*. 2003; **361**: 1801-9.

83 Repessé Y, Slaoui M, Ferrandiz D, Gautier P, Costa C, Costa JM, Lavergne JM, Borel-Derlon A. Factor VIII (FVIII) gene mutations in 120 patients with hemophilia A: detection of 26 novel mutations and correlation with FVIII inhibitor development. *J Thromb Haemost*. 2007; **5**: 1469-76.

84 Guillet B, Lambert T, d'Orion R, Proulle V, Plantier JL, Rafowicz A, Peynet J, Costa JM, Bendelac L, Laurian Y, Lavergne JM. Detection of 95 novel mutations in coagulation factor VIII gene *F8* responsable for hemophilia A: results from a single institution. . *Human Mutat*. 2006; **27**: 676-85.

85 Naylor J, Brinke A, Hassock S, Green PM, Giannelli F. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. *Human Molecular Genetics*. 1993; **2**: 1773-8.

86 Jacquemin M, De Maeyer M, D'Oiron R, Lavend'Homme R, Peerlinck K, Saint-Remy JM. Molecular mechanisms of mild and moderate hemophilia A. *J Thromb Haemost*. 2003; **1**: 456-63.

87 Cutler JA, Mitchell MJ, Smith MP, Savidge GF. The identification and classification of 41 novel mutations in the factor VIII gene (*F8*C). *Hum Mutat*. 2002; **19**: 274 - 8.

88 Krawczak M, Reiss J, Cooper DN. The mutational spectrum of single base-pair substitution in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Human Genetics*. 1992; **90**: 41-54.

89 Young M, Inaba H, Hoyer LM, Higuchi M, Kazazian HH, Antonarakis SE. Partial correction of a Severe Molecular defect in Hemofilia A, because of Errors during Expression of the Factor VIII Gene. *Am J Hum Genet*. 1997; **60**: 565-73.

90 Oron-Karni V, Filon D, Rund D, Oppenheim A. A novel mechanism generating short deletion/insertions following slippage is suggested by a mutation in the human alfa2-globin gene. *Hum Mol Genet*. 1997; **6**: 881-5.

91 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*. 2009; **7**: 367-9.

92 Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*. 1994; **5**: 64-7.

93 Lee DH, Walker IR, Teitel J, Poon MC, Ritchie B, Akabutu J, Sinclair GD, Pai M, Wu JW, Reddy S, Carter C, Growe G, Lillicrap D, Lam M, MA B. Effect of the factor V Leiden mutation on the clinical expression of severe hemophilia A. *Thromb Haemost :*. 2000; **83**: 387-91.

94 Tizzano EF, Soria JM, COLL I, Guzmán B, Cornet M, Altisent C, Martorell M, Domenech M, Rio E, Fontcuberta J, Baiget M. The prothrombin 20210A allele influences clinical manifestations of hemophilia A in patients with intron 22 inversion and without inhibitors. *Haematologica*. 2002; **87**: 279-85.

95 Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 30-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*. 1996; **88**: 3698-703.

96 Healey JF, Barrow RT, Tamim HM, Lubin IM, Shima M, Scandella D, Lollar P. Residues Glu2181-Val2243 contain a major determinant of the inhibitory epitope in the C2 domain of human factor VIII. *Blood*. 1998; **92**: 3701-9.

97 Scandella D, Gilbert GE, Shima M, Nakai H, Eagleson C, Felch M, Prescott R, Rajalakshmi KJ, Hoyer LW, Saenko E. Some factor VIII inhibitor antibodies recognize a common epitope corresponding to C2 domain amino acids 2248 through 2312, which overlap a phospholipid-binding site. *Blood*. 1995 Sep 1(5):. **86**: 1811-9.

98 Jacquemin M, Lavend'homme R, Benhida A, Vanzieleghem B, d'Oiron R, Lavergne J-M, Brackmann HH, Schwaab R, VandenDriessche T, Chuah MKL, Hoylaerts M, Gilles JG, Peerlinck K, Vermylen J, Saint-Remy J-M. A novel cause of mild/moderate hemophilia A: mutations scattered in the factor VIII C1 domain reduce factor VIII binding to von Willebrand factor *Blood*. 2000; **96**: 958-65.

99 El-Maari O, Herbiniaux U, Graw J, Schröder J, Terzic A, Watzka M, Brackmann HH, Schramm W, Hanfland P, Schwaab R, Müller CR. Analysis of mRNA in hemophilia A patients with undetectable mutations reveals normal splicing in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost*. 2005; **3**: 332-9.

100 El-Maari O, Singer H, Klein C, Watzka M, Herbiniaux U, Brackmann HH, Schröder J, Graw J, Müller CR, Schramm W, Schwaab R, Haaf T, Hanfland P, Oldenburg J. Lack of mRNA: a novel mechanism leading to hemophilia A. *Blood*. 2006; **107**: 2759-65.