

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**GENÉTICA, PATOLOGIA MOLECULAR E FORMAÇÃO DE INIBIDORES  
ANTI-FVIII NA HEMOFILIA A**

**CLÉVIA ROSSET**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

**Orientador: Francisco M. Salzano**

**Co-orientadora: Eliane Bandinelli**

**Porto Alegre, Março de 2013.**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Hemostasia do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pelo Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX).

## **AGRADECIMENTOS**

*Ao Professor Salzano, pelos seus ensinamentos e grande exemplo de empenho e dedicação à pesquisa.*

*À Professora Eliane Bandinelli, pelos seus ensinamentos, amizade e paciência.*

*Ao Igor e à Roberta, pelo auxílio fundamental na realização desse projeto e pela amizade.*

*Aos colegas e ex-colegas de laboratório de Hemostasia, Mariana Botton, Ana Maria, Ana Paula, Patrícia, Mariana, Marina e Maievi pela amizade, ajuda e convívio sempre agradável.*

*Ao grupo de Bioinformática do Laboratório de Imunogenética da UFRGS, pelo auxílio na parte de bioinformática deste projeto.*

*Aos meus pais, pelo apoio incondicional, carinho e incentivo.*

*Ao meu namorado, Diógenes, pelo amor, enorme paciência e apoio em todos os momentos.*

*A todos os meus amigos, colegas e à minha irmã, Sabrina, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e pelos momentos importantes que passamos juntos.*

*Aos professores do Departamento de Genética e à UFRGS, pelo ensino de qualidade.*

*Ao Elmo, pela sua ajuda sempre que foi necessário.*

## SUMÁRIO

RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	9
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....	11
1. Introdução.....	11
1.1. A Hemostasia.....	11
1.1.1. A Via Clássica da Coagulação Sanguínea.....	13
1.1.2. O Modelo Celular da Coagulação Sanguínea.....	15
1.2. O Fator VIII da Coagulação .....	18
1.2.1. O Gene e a Estrutura do FVIII.....	19
1.2.2. Síntese e Secreção do FVIII .....	24
1.2.3. Sítios de Interação do FVIII .....	25
1.2.4. Inativação e Depuração do FVIII .....	28
1.3. Hemofilia A .....	31
1.3.1. Sintomatologia e Diagnóstico da Hemofilia A.....	32
1.3.2. O Tratamento da Hemofilia A .....	33
1.3.3. Complicações do Tratamento: A Formação de Inibidores anti-FVIII.....	37
1.4. Mutações no F8 e a Hemofilia A.....	38
1.5. O Tipo de Mutação e o Desenvolvimento de Inibidores Anti-FVIII .....	51
1.6. Relação Estrutura-Função: Bioinformática Estrutural .....	53
2. Objetivos.....	54
2.1. Objetivo geral .....	54
2.2. Objetivos específicos.....	54
CAPÍTULO 2 - DETECTION OF NEW MUTATIONS AND MOLECULAR PATHOLOGY OF MILD AND MODERATE HAEMOPHILIA A PATIENTS FROM SOUTHERN BRAZIL.....	55
CAPÍTULO 3 - FACTOR VIII MUTATIONS AND INHIBITOR FORMATION IN A SOUTHERN BRAZILIAN POPULATION .....	88
CAPÍTULO 4 - DISCUSSÃO GERAL.....	96
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	100
Referências Bibliográficas.....	101
Anexos .....	119

## LISTA DE ABREVIATURAS

APC: Proteína C ativada

CAPM: Cininogênio de alto peso molecular

F8: Gene do Fator VIII da coagulação

FVa: Fator V da coagulação ativado

FVII: Fator VII da coagulação

FVIII: Fator VIII da coagulação

FVIIIa: Fator VIII da coagulação ativado

FIX: Fator IX da coagulação

FIXa: Fator IX da coagulação ativado

FX: Fator X da coagulação

FXa: Fator X da coagulação ativado

FT: Fator Tecidual

FvW: Fator de von Willebrand

HA: Hemofilia A

IL: Interleucina

LRP: *Low-density lipoprotein receptor-related protein*

MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade

MLPA: *Multiplex Dependent-ligation probe amplification*

Pb: Pares de bases

RE: Retículo endoplasmático

RNAm: RNA mensageiro

TP: Tempo de Protrombina

TTPA: Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Formação do tampão plaquetário.....	13
<b>Figura 2.</b> A via clássica da cascata da coagulação sanguínea.....	14
<b>Figura 3.</b> Modelo celular da coagulação sanguínea.....	18
<b>Figura 4.</b> Estrutura e ativação do FVIII.....	21
<b>Figura 5.</b> A estrutura tridimensional do FVIII com o domínio B deletado.....	23
<b>Figura 6.</b> Estrutura-função do fator VIII: principais sítios de interação do fator VIII.....	27
<b>Figura 7.</b> Estrutura do fator VIII sem o domínio B e alguns de seus sítios de interação.....	28
<b>Figura 8.</b> O ciclo de vida do FVIII.....	30
<b>Figura 9.</b> Principais sítios polimórficos do F8.....	46

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Distribuição das mutações já descritas entre os 26 éxons do FVIII em pacientes leves e moderados.....	41
<b>Tabela 2.</b> Mutações recorrentes no F8.....	45
<b>Tabela 3.</b> Alguns estudos e as diferentes mutações encontradas em hemofílicos A graves, moderados e leves em populações no mundo.....	48
<b>Tabela 4.</b> Distribuição dos altos títulos de inibidores, em relação ao tipo de mutação em 201 pacientes com inibidores.....	52

## RESUMO

A deficiência parcial ou total ou defeitos funcionais no fator VIII (FVIII) resultam na doença hereditária hemofilia A (HA), geralmente causada por mutações heterogêneas no gene do FVIII (F8). Embora mais de 1200 mutações no gene do F8 tenham sido descritas, dados sobre o espectro dessas mutações na população do Sul do Brasil são insuficientes e o estudo das mesmas possibilita uma melhor compreensão da genética molecular da doença nessa população. Além disso, ao estimar o efeito que uma mutação exerce em uma proteína, obtêm-se subsídios para uma melhor avaliação de sua função, bem como das interações entre ela e estruturas afins. Os objetivos desse estudo foram identificar as mutações gênicas em pacientes com HA leve ou moderada do Rio Grande do Sul e posterior análise do papel dessas mutações na determinação da doença e presença de inibidores. Um total de 76 pacientes não-relacionados do sexo masculino, com HA leve (n=55) ou moderada (n=21) foram incluídos no estudo. Todos os 26 éxons do F8, as regiões 5' não-traduzida e 3' não-traduzida, as junções éxon-intron e a região promotora foram amplificadas por PCR e analisadas por sequenciamento direto. Foram examinados também 100 cromossomos normais de doadores de banco de sangue para excluir mudanças polimórficas como causadoras da doença. Todas as sequências do F8 dos pacientes foram comparadas com a sequência referência (NCBI: NG\_005114.1), utilizando o *software* CodonCode Aligner implementado no Mega 5.04. As mutações encontradas foram comparadas com as do banco de dados *The Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site* (HAMSTeRS) e a conservação dos aminoácidos mutados também foi verificada. A detecção de mutações em sítios de processamento foi realizada pelo programa de predição de sítios de processamento (*Berkeley Drosophila Genome Project*) e para a análise do efeito das mutações de sentido trocado foram utilizados três preditores: PolyPhen-2 (*Polymorphism Phenotyping*), *Site Direct Mutator* (SDM) e *Have yOur Protein Explained* (HOPE). A localização das mutações na estrutura do FVIII foi realizada no programa PyMol e para a visualização da superfície eletrostática dos domínios A foi utilizado o programa GRASP2. Quando nenhuma mutação foi encontrada, foi executada a análise de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA). Quanto às mutações recorrentes, a análise de haplótipos foi feita a fim de investigar se elas surgiram nessa população através de vários eventos mutacionais distintos ou através de efeito fundador. Foi identificada a mutação causadora da doença em 69 (91%) pacientes, que apresentaram 33 mutações diferentes: 27 de sentido trocado, uma pequena deleção, duas pequenas duplicações e três mudanças em sítios de processamento. Sete mutações de sentido trocado e duas em



sítios de processamento não tinham sido previamente descritas no HAMSTeRS e não foram identificadas na literatura. Todas as últimas foram consideradas patogênicas; a mutação p.Val266Met, muito próxima a um sítio de ligação ao cobre, pode diminuir a interação entre os domínios A2 e A3 do FVIII; a mutação p. Met567Lys pode afetar um sítio de ligação ao fator IX; as mutações p.Arg1764Gly, p.Tyr1786Phe e p.Tyr1792Cys podem afetar a ligação ao fator IX e ao Fator von Willebrand. Nove mutações recorrentes foram encontradas, uma delas nunca descrita anteriormente (p.Tyr1786Phe). A análise de haplótipos sugere que essa mutação tenha se originado na população brasileira como um único evento em um ancestral comum. Um dos indivíduos desenvolveu inibidores. Foi feita, também, uma avaliação geral sobre o papel das mutações no F8 na formação de inibidores em pacientes graves estudados em investigação anterior, verificando-se associações significativas tanto no que se refere aos domínios em que as mutações ocorreram, quanto aos tipos de mutações encontrados. Os dados desses estudos são úteis no diagnóstico e prevenção precoce de inibidores na hemofilia A, bem como na detecção de mulheres heterozigotas na população do sul do Brasil. Espera-se oferecer um melhor manejo aos pacientes, fornecer aconselhamento genético e suporte psicológico/emocional para as famílias dos afetados.

## ABSTRACT

Factor VIII (FVIII) partial or total deficiency, or functional defects, result in the hereditary disease haemophilia A (HA), generally caused by heterogeneous mutations in the FVIII gene (F8). Although more than 1200 F8 mutations have been reported, data regarding these mutations are insufficient in southern Brazilian populations and their study provides a better understanding of the molecular genetics of the disease in this population. Furthermore, after evaluating the effect that a mutation has on a protein, we can do a better assessment of its function, as well as of the interactions between the mutated protein and related structures. The objectives of this study were to identify gene mutations in patients with mild and moderate HA living in the southern Brazilian state of Rio Grande do Sul and to analyze the role of these mutations in disease determination and presence of inhibitors. A total of 76 unrelated male patients with mild (n = 55) or moderate (n = 21) HA were included in the study. All F8 26 exons, the 5' UTR and 3' UTR, intron-exon junctions and the promoter region were amplified by PCR and analyzed by direct sequencing. We also examined 100 blood bank donors' normal chromosomes to exclude polymorphic changes as causal to the disease. F8 patients' sequences were compared with the reference sequence (NCBI: NG\_005114.1) using the CodonCode Aligner software implemented in Mega 5.04. The mutations found were compared with those present in *The Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site* (HAMSTeRS) database and the conservation of the mutated amino acids was also verified. Splice site mutations were detected using the Berkeley Drosophila Genome Project splice site prediction program, and for the analysis of missense mutation effects three predictors were used: PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping), Site Direct Mutator (SDM) and Have yOur Protein Explained (HOPE). The mutations were localized in the FVIII structure by PyMOL and the FVIII A domains electrostatic surface was visualized using GRASP2. When no mutation was found, the Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) analysis was performed. As for the recurrent mutations, haplotype analyses were conducted to investigate whether they emerged in this population through several distinct mutational events or from a founder effect. We identified the disease causing mutation in 69 (91%) patients, who showed 33 different mutations: 27 missense, one small deletion, two small duplications and three splice site changes. Seven missense and two splice site mutations had not been previously reported in HAMSTeRS and were not identified in any literature search. The latter were all considered pathogenic; p.Val266Met is located near a copper binding site and may decrease the interaction between the FVIII A2 and A3 domains; p. Met567Lys can affect a factor IX

binding site; p.Arg1764Gly, p.Tyr1786Phe and p.Tyr1792Cys can affect factor IX and von Willebrand Factor binding sites. Nine recurrent mutations were found, one of them (p.Tyr1786Phe) never described before. Haplotype analysis suggests that this mutation originated in the Brazilian population as a single event in a common ancestor. One of the subjects developed inhibitors. A general evaluation was also made about the role of F8 mutations in the development of inhibitors in severe patients studied in a previous investigation, and significant associations were found both in relation to the domains where the mutations occurred, as well as in the mutations found. The data of these studies will be useful in the diagnosis and early prevention of inhibitors in haemophilia A, and in the detection of female carriers in the southern Brazilian population. We hope to offer a better monitoring to the patients, to give genetic counseling, and psychological/emotional support to the families of affected persons.

### 1. Introdução

As coagulopatias hereditárias são doenças hemorrágicas resultantes da deficiência quantitativa e/ou qualitativa de um ou mais fatores de coagulação, levando à diminuição da coagulação do sangue. Elas abrangem diversas condições clínicas, sendo caracterizadas por hemorragias de gravidade variável em diferentes locais do corpo. Dentre essas desordens hemorrágicas, a doença de von Willebrand e as hemofilias A e B, juntas, afetam cerca de 97% dos indivíduos com alguma deficiência na hemostasia (Peyvandi *et al.*, 2006). Esclarecer os mecanismos causais e a patologia molecular dessas doenças pode ser útil na busca por formas de prevenção, alívio dos sintomas ou tratamentos mais eficientes para as mesmas.

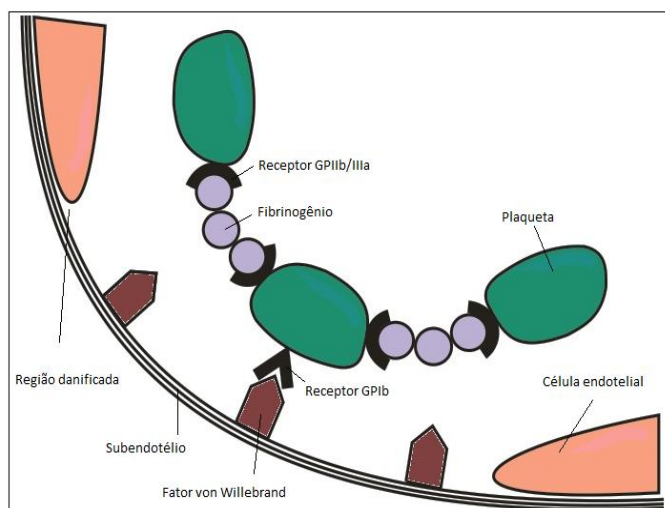
#### 1.1. A Hemostasia

O processo de hemostasia envolve um mecanismo complexo, dinâmico, finamente regulado e, sobretudo, vital na defesa contra a perda de sangue e início do reparo tecidual. Através desse processo, o sangue se mantém fluido e dentro dos vasos sanguíneos. Se ocorrer um extravasamento de sangue dos vasos ou ele não permanecer líquido, surgem certas modificações que estancam o sangramento ou atuam na fluidez sanguínea (Tuddenham & Cooper, 1994). Se qualquer uma dessas mudanças ocorrerem de maneira desregulada, a hemostasia é comprometida, podendo resultar na perda excessiva de sangue ou na formação de trombos.

A formação de um coágulo (coagulação) e a sua degradação (fibrinólise) dependem do processo hemostático (Marcus & Safier, 1993). Esse processo ocorre através das seguintes etapas: vasoconstrição no sítio de injúria vascular; formação do tampão de plaquetas (adesão, ativação e agregação plaquetária); ativação da cascata de coagulação sanguínea, levando à formação da rede de fibrina; e dissolução da rede de fibrina.

Os eritrócitos representam a maior parte da massa celular intravascular em um vaso com fluxo sanguíneo normal. Por causa do processo hemodinâmico de migração axial durante a circulação sanguínea, a maioria dos eritrócitos passa pela área central do lúmen vascular. Conseqüentemente, perto da parede dos vasos, há uma camada livre de eritrócitos que é

enriquecida em plaquetas. Assim, quando um vaso sanguíneo é danificado, levando ao extravasamento de sangue, as células sanguíneas (principalmente as plaquetas) ficam expostas ao colágeno e fibroblastos subjacentes ao endotélio vascular. A primeira etapa do processo para estancar esse sangramento consiste na vasoconstrição no sítio da injúria vascular, o que faz diminuir o fluxo sanguíneo no local e conseqüentemente reduz a perda de sangue. A segunda etapa, também conhecida como hemostasia primária, vai levar à formação do trombo ou tampão plaquetário. Nessa etapa, o Fator de von Willebrand (FvW), um multímero produzido normalmente pelas células do endotélio, está na sua conformação enovelada e se liga imediatamente ao colágeno subendotelial e também às células endoteliais danificadas. Essa reação causa o desenovelamento do FvW, expondo os seus domínios A1, os quais subsequentemente capturam e ligam-se às plaquetas através de uma glicoproteína específica na superfície destas (GPIb). A interação A1-GPIb leva à ativação de outro receptor das plaquetas, a integrina GPIIb/IIIa. Esta integrina liga-se à sequência de adesão no domínio C1 do FvW, resultando em adesão plaquetária estável e levando à auto-ativação das plaquetas (**Figura 1**). As plaquetas ativadas assumem formas mais esféricas e emitem pseudópodos, forçando a liberação de seus grânulos citoplasmáticos como ADP, tromboxano e serotonina, os quais atraem outras plaquetas para o local de lesão (Marcus & Safier, 1993). O complexo plaquetário Iib/IIIa ainda se liga ao fibrinogênio circulante (**Figura 1**), resultando em agregação plaquetária. Esse processo auto-amplificador é controlado por sinais de células endoteliais, para restringir o tampão plaquetário no local do dano vascular (Stassen *et al.*, 2004). Em pequenos vasos, as plaquetas são capazes de interromper um sangramento. Sangramentos extensos, todavia, necessitam da formação da rede de fibrina (coagulação), também conhecida como hemostasia secundária. As plaquetas ativadas ainda expõem em sua membrana fosfolipídios essenciais para as reações de coagulação, que ocorrem paralelamente à agregação plaquetária. O caráter essencial desse processo de coagulação é que uma proteína circulante, solúvel no plasma, o fibrinogênio, transforma-se em fibrina, o coágulo sólido e insolúvel, que estabiliza o tampão plaquetário (Marcus & Safier, 1993).



**Figura 1. Formação do tampão plaquetário.** O Fator de von Willebrand forma uma ponte entre as fibras de colágeno e uma glicoproteína específica na superfície das plaquetas (GPIb), promovendo a adesão plaquetária e a expressão do complexo plaquetário IIb/IIIa, ativando as plaquetas. O complexo plaquetário IIb/IIIa também se liga ao fibrinogênio circulante, resultando em agregação plaquetária. **Figura original.**

### 1.1.1. A Via Clássica da Coagulação Sanguínea

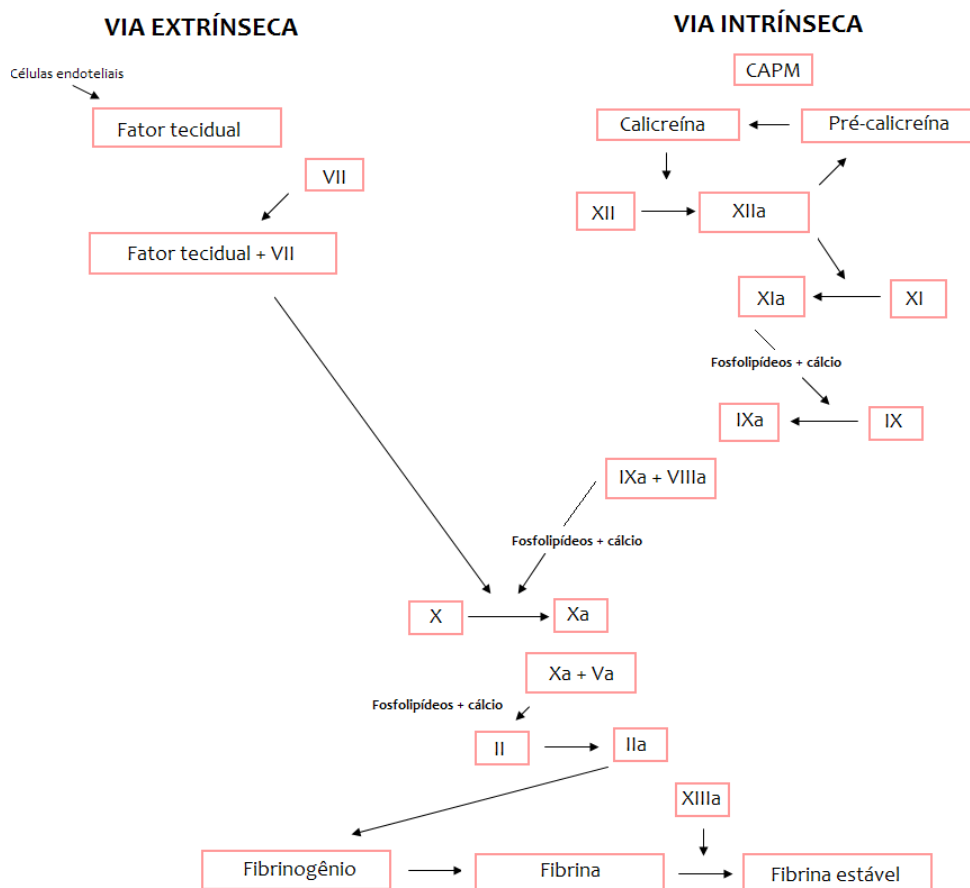
Em 1964, Macfarlane e Davie & Ratnoff propuseram a hipótese clássica para explicar a fisiologia da coagulação do sangue. A proposta compreende as vias intrínseca e extrínseca. Nas duas vias atuam cerca de 20 fatores plasmáticos, quase todos de natureza protéica, sendo a maioria enzimas que circulam em estado não ativado (zimogênios) no sangue, suscetíveis à ativação em cascata pelo fator anterior ativo (**Figura 2**). O sistema funciona como uma cascata amplificadora: o fator que dá início ao processo está em pequena quantidade, mas é capaz de ativar um número muito maior do próximo fator da cascata, e assim por diante. Vários processos de retroalimentação positivos e negativos regulam a cascata de coagulação (Broze, 1995).

O início da via extrínseca depende de um fator não circulante, o fator tecidual (FT), também conhecido como tromboplastina, e ocorre de forma explosiva. A lesão do vaso provoca a liberação de FT pelas células endoteliais, o qual, por sua vez, liga-se às formas zimogênicas do fator VII presentes no sangue. Essa ligação ativa o fator VII, promovendo a formação do complexo tenase extrínseco, que depende do cálcio e consiste na interação entre o FT e o fator VII ativado (Tuddenham & Cooper, 1994). O complexo tenase extrínseco catalisa a ativação do fator X (FX).

A via intrínseca, ou via do contato mediada por superfície negativa, depende de um fator circulante (fator XII) e ocorre de forma mais lenta. Ela inicia pelo contato do sangue com superfícies de carga negativa, tal como o colágeno *in vivo* e o vidro ou partículas de caolin *in vitro*. Nestas superfícies, o cininogênio de alto peso molecular começa a ativar o fator XII. Esse fator XII ativado, por sua vez, ativa o fator XI, e o fator XI ativado participa da formação

do complexo tenase intrínseco, dependente de cálcio e fosfolípídeos de membrana. O complexo tenase intrínseco ativa o fator IX (FIX), o qual por sua vez, na presença do fator VIII ativado (FVIIIa), ativa o FX (Tuddenham & Cooper, 1994).

A partir da ativação do FX, o mecanismo observado na via extrínseca e intrínseca é o mesmo (via comum). O fator X ativado (FXa) ativa o fator V, possibilitando a formação do complexo protrombinase (FXa-Va). O complexo protrombinase, que também depende de cálcio, leva à conversão da protrombina (fator II) em trombina (fator IIa). Uma grande quantidade de trombina é formada neste momento. Essa trombina promove a transformação do fibrinogênio em monômeros de fibrina, que logo se combinam para formar polímeros, além de ativar o fator XIII. O fator XIII ativado estabiliza o coágulo. O processo é finalizado com a formação de um aglomerado de plaquetas e células, como os eritrócitos, o que consolida o coágulo que sela a lesão e interrompe o extravasamento sanguíneo (Tuddenham & Cooper, 1994; Broze, 1995).



**Figura 2. A proposta clássica da cascata da coagulação sanguínea.** Representação esquemática das Vias Extrínseca e Intrínseca da Coagulação. **Figura original.**

Atualmente, a divisão do sistema de coagulação do sangue em intrínseco e extrínseco, assim como a ausência de plaquetas e outros elementos celulares, são consideradas inadequadas do ponto de vista da fisiologia da coagulação, tendo em vista que essa divisão limita a aplicação do modelo *in vivo* (Becker, 2005). Esses mecanismos não atuam independentemente, mas interagem de modo complementar (Bolton-Maggs & Pasi, 2003). Apesar disso, a utilização dos termos intrínseco e extrínseco ainda pode ser útil na interpretação dos exames laboratoriais utilizados para a avaliação da hemostasia. A partir da visão clássica da coagulação foram desenvolvidos os testes *in vitro* Tempo de Protrombina (TP), Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) e as dosagens dos Fatores de Coagulação.

### 1.1.2. O Modelo Celular da Coagulação Sanguínea

Em 2001, foi proposto um novo modelo de coagulação sanguínea, que melhor representaria o que ocorre *in vivo* durante o reparo de uma lesão endotelial. As teorias anteriores, derivadas da hipótese da cascata clássica, sugeriam que fatores de coagulação eram os responsáveis pelo controle da hemostasia em sistemas onde as células somente forneceriam uma superfície com carga negativa (fosfatidilserina) sobre as quais os complexos pró-coagulantes podiam ser montados. No novo modelo, as células com conteúdo similar de fosfatidilserina são capazes de desempenhar papéis diferentes, dependendo de seus receptores específicos. O modelo estabelece uma visão fisiológica, integrada e funcional dos eventos bioquímicos complexos que ocorrem nas superfícies celulares, ao invés de cascatas distintas e relativamente independentes que operam em sistemas estáticos (Becker, 2005). Ele enfoca a interação dos fatores da coagulação com superfícies celulares específicas e ocorre em três estágios que se sobrepõem (Iniciação, Amplificação e Propagação) e que ocorrem em diferentes células, até a formação da rede estável de fibrina (**Figura 3**) (Hoffman & Monroe, 2001; Hoffman, 2003).

O FT é o iniciador fisiológico primário da coagulação (Hoffman & Monroe, 2001). Ele não é normalmente expresso em células em contato direto com o sangue (células endoteliais e leucócitos), mas apresenta expressão constitutiva em fibroblastos subjacentes ao endotélio vascular e células de músculo liso das camadas mais profundas dos vasos sanguíneos. Células endoteliais e monócitos podem expressá-lo na vigência de lesão endotelial e na presença de estímulos específicos, tais como endotoxinas e citocinas (Wilcox *et al.*, 1989). A etapa de



iniciação na hemostasia normal começa na superfície de células extravasculares carreadoras de FT (fibroblastos do estroma e macrófagos) ou na superfície de células mononucleares e endoteliais que passam a expressá-lo. Essas células expõem o FT ao sangue após um dano vascular ou inflamação, o qual então se liga ao fator VII (FVII) da coagulação, formando um complexo na superfície da célula carreadora de FT, que é crucial para a auto-ativação do FVII. O complexo FVII ativado/FT ativa pequenas quantidades dos fatores IX e X (Hoffman & Monroe, 2001). O FXa, por sua vez, pode ativar pequenas quantidades de fator V, e tanto o FXa quanto o fator V ativado (FVa) permanecem na vizinhança da célula carreadora de FT (Roberts *et al.*, 2004). Essa pequena quantidade de FXa ainda leva à geração de pequenas quantidades de trombina que são insuficientes para promover a formação de fibrina efetiva. Entretanto, a trombina que é formada inicialmente vai participar da próxima etapa, ativando os fatores XI, VIII, maior quantidade de fator V e mais plaquetas, para promover e amplificar a coagulação (Hoffman & Monroe, 2001).

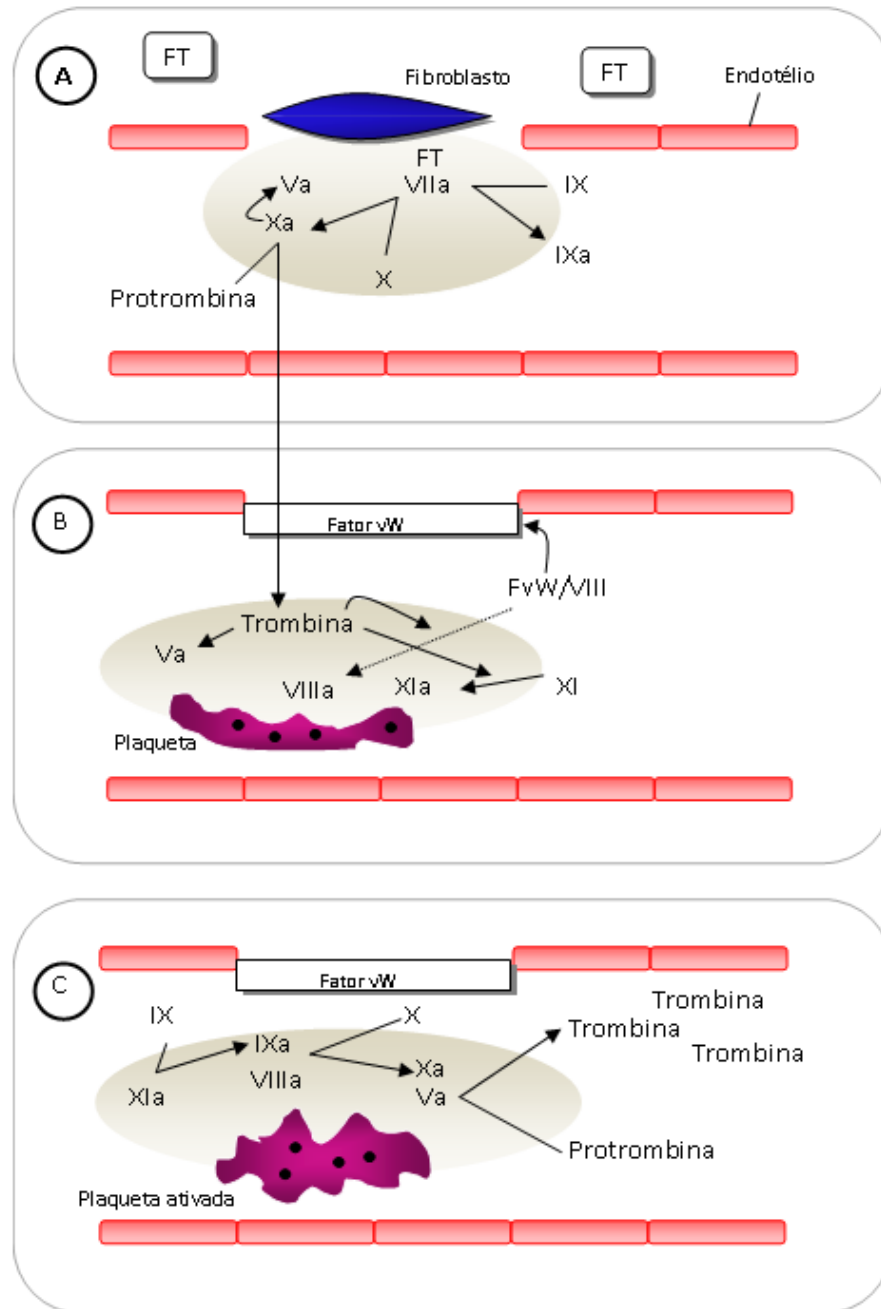
A etapa de amplificação ocorre basicamente na superfície das plaquetas (**Figura 3**). A trombina inicial ativa as plaquetas (Hoffman & Monroe, 2001; Roberts *et al.*, 2004) e as plaquetas em ativação liberam fator V parcialmente ativado (em maior quantidade que na iniciação) e expõem seus receptores de ligação a fatores de coagulação. O fator V será completamente ativado pela trombina. O complexo fator VIII/FvW liga-se nos receptores expostos nas plaquetas e é clivado pela trombina para ativar o fator VIII e liberar o FvW. O FVIIIa permanece ligado à superfície da plaqueta, enquanto o FvW no subendotélio promove adesão plaquetária, que, como já citado, ocorre paralelamente à coagulação (Hoffman & Monroe, 2001; Federici, 2003). O fator XI também é ativado pela trombina na superfície das plaquetas (Huntington, 2005). Na sequência, esse fator XI ativa maiores quantidades de FIX agora na superfície das plaquetas (Gailani, 2000), já que uma pequena quantidade desse fator já foi ativada pelo complexo FVII ativado/FT na etapa de iniciação, na superfície de células carreadoras de FT.

Depois que todos os fatores de coagulação estão ativados, na etapa de propagação, a superfície das plaquetas serve para ligar os cofatores VIIIa e Va primeiramente (**Figura 3**), seguida pela ligação de suas enzimas respectivas, fator IX ativado (FIXa) e FXa. A função fisiológica do fator VIII (FVIII) é atuar como um acelerador, aumentando em milhares de vezes a ativação do FX pelo FIXa. O complexo de ativação (VIIIa/IXa), também conhecido como complexo tenase, ativa o FX. O FXa, que se formou na superfície de células carreadoras de FT durante a iniciação, não pode se mover até as plaquetas ativadas, por isso o complexo tenase ativa o FX diretamente na superfície plaquetária. O FXa forma o complexo

protrombinase com seu cofator, o FVa (Hoffman & Monroe, 2001). Esse complexo, formado na superfície fosfolipídica das plaquetas ativadas, converte a protrombina em trombina (Hoffbrand *et al.*, 2001; Butenas & Mann, 2002). O complexo protrombinase é capaz de converter grandes quantidades de protrombina em trombina, multiplicando as quantidades de trombina que foram produzidas durante a etapa de iniciação (Roberts *et al.*, 2004).

A trombina em grande quantidade cliva rapidamente os dímeros de fibrinogênio nas extremidades N-terminais das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  da molécula, o que resulta na liberação dos fibrinopeptídeos A e B, os quais formam um monômero de fibrina capaz de auto-associação linear e lateral, resultando em um coágulo de fibrina insolúvel, que estabiliza o agregado plaquetário. A trombina ainda ajuda a estabilizar o coágulo de fibrina através da ativação da transglutaminase fator XIII (Huntington, 2005) na presença de íons cálcio (Hoffbrand *et al.*, 2001). Essa é a última etapa do processo hemostático.

Todo o processo de coagulação é regulado por outros componentes fisiológicos circulantes. O FXa é rapidamente inibido pela via do inibidor do fator tecidual ou pela antitrombina se ele deixar o ambiente protegido da superfície da célula carreadora de FT durante a etapa de iniciação (Hoffman & Monroe, 2001). A via regulatória composta pelo plasminogênio também tem um papel importante na degradação da rede de fibrina gerada pela ativação do processo hemostático. Nessa via, o plasminogênio ativado gera plasmina, que atua na degradação da fibrina em fibrinogênio e na ativação de metaloproteinases de matriz responsáveis pela degradação da matriz extracelular (Collen, 1999).



**Figura 3. Modelo celular da coagulação sanguínea.** Representação esquemática das etapas de **A.** iniciação; **B.** amplificação e **C.** propagação. Todas as reações ocorrem nas superfícies das células representadas em cada etapa. As flechas indicam as reações de ativação dos fatores da coagulação. **Figura original.**

## 1.2. O Fator VIII da Coagulação

O FVIII é uma glicoproteína sintetizada principalmente em hepatócitos (Wion *et al.*,1985). O RNA mensageiro (RNAm) do FVIII também foi encontrado em vários outros tecidos, como

baço, rins, linfonodos, placenta, pâncreas, células endoteliais e músculos. Portanto, a expressão do FVIII não é restrita ao fígado, ao contrário de outros fatores de coagulação (Furie & Furie, 1988). O FVIII é essencial para a coagulação sanguínea (Figuras 2 e 3) servindo como cofator para o FIXa (serinoprotease) na conversão do FX em FXa (Tuddenham & Cooper, 1994). A estabilidade do FVIII depende da interação não-covalente com o FvW, que também atua na adesão e agregação plaquetárias. O FvW protege o FVIII da degradação e da endocitose, além de concentrá-lo no seu sítio de ação. Sem a ligação ao FvW, o FVIII é rapidamente degradado na circulação (Jacquemin & Saint-Remy, 1998), o que leva à alteração dos níveis normais de FVIII plasmáticos (50-150U/dl). Além do FvW, outros fatores podem interferir nos níveis de FVIII em pessoas saudáveis, como a idade e o sexo (Balleisen *et al.*, 1985; Tracy *et al.*, 1992; Conlan *et al.*, 1993; Lowe *et al.*, 1997), o uso de contraceptivos orais (Schlit *et al.*, 1995; Lowe *et al.*, 1997), o fumo (Conlan *et al.*, 1993), o índice de massa corporal (Conlan *et al.*, 1993; Cushman *et al.*, 1996), o tipo sanguíneo ABO (Jeremic *et al.*, 1976), os níveis de colesterol total, lipoproteína de baixa densidade, triglicerídeos (Cushman *et al.*, 1996) e a atividade coagulante do FIX (Lowe *et al.*, 1997). Também foi encontrada uma contribuição substancial de outros genes na variação dos níveis plasmáticos de FVIII (Kamphuisen *et al.*, 1998; de Lange *et al.*, 2001).

### **1.2.1. O Gene e a Estrutura do FVIII**

O gene da proteína FVIII (F8) está localizado na extremidade distal do braço longo do cromossomo X (Xq28) e possui 186 kb de DNA genômico com 26 éxons, que variam em tamanho de 69 a 3106 pares de bases (pb). Os íntrons são grandes (variam de 14 a 32 kb) e representam cerca de 95% do gene (177kb) (Gitscheir *et al.*, 1984), e, desde que o F8 foi clonado neste mesmo ano, têm sido descritas um grande número de mutações causadoras de problemas de coagulação. O íntron 22 possui uma ilha CpG que age como um promotor bidirecional para dois genes adicionais (F8A e F8B). F8A, um gene sem íntrons, é transcrito em direção oposta ao F8, enquanto o gene B é transcrito na mesma direção que o F8. A função das proteínas originadas pelos transcritos desses dois genes ainda não é conhecida.

O sítio de início da transcrição do F8 foi mapeado na posição -170, implicando que o RNAm do F8 tem uma longa região 5' não-traduzida. O segmento do F8 entre as posições -1175/-9 tem atividade promotora. Estudos indicam que o F8 possui sítios de ligação para os fatores de transcrição específicos do fígado C/EBP, HNF4 e HNF1 (Figueiredo & Brownlee, 1995). O RNAm do F8 compreende cerca de 9.010 nucleotídeos que codificam um

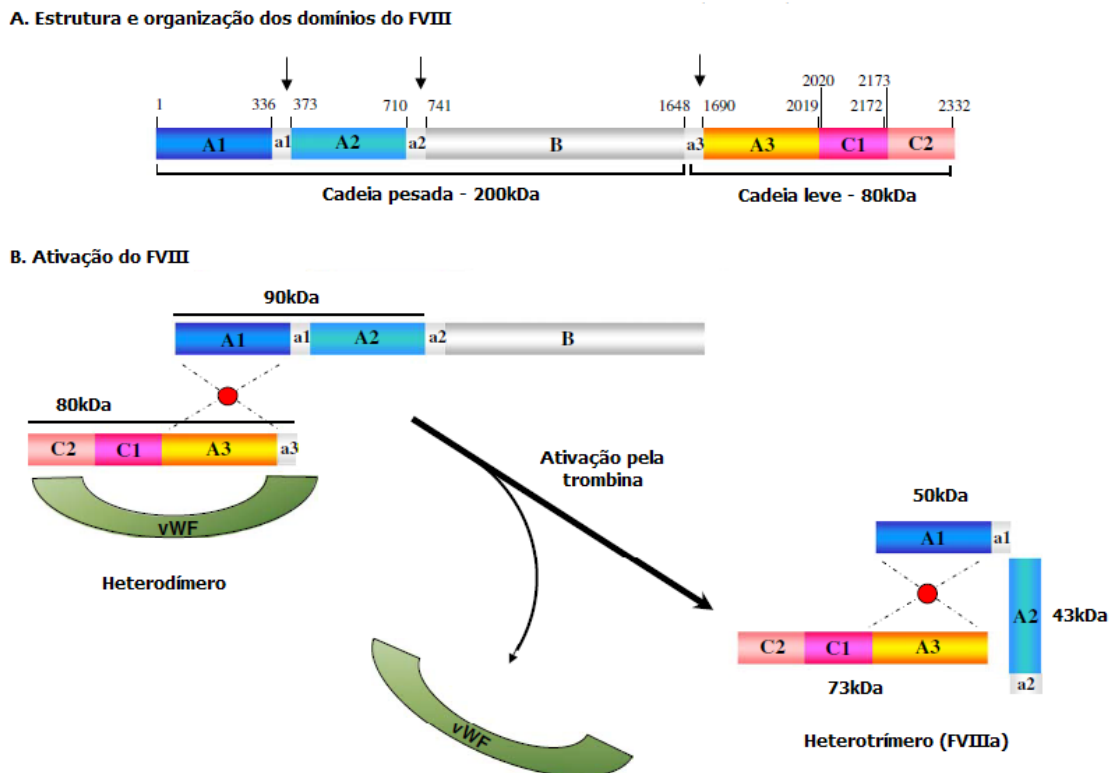
polipeptídeo precursor de 2.351 aminoácidos. Após o processamento do peptídeo sinal (19 aminoácidos), origina-se uma proteína madura de 2.332 aminoácidos (Vehar *et al.*, 1984). A proteína madura foi isolada e purificada por Fay *et al.* (1982) e sua estrutura primária foi primeiramente descrita em 1984 (Gitscheir *et al.*, 1984; Vehar *et al.*, 1984).

Na sua forma nativa, o FVIII consiste em três domínios estruturais diferentes designados A, B e C (NH<sub>2</sub>-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH) (Kane & Davie, 1988). Os domínios A são flanqueados por pequenos espaçadores (a1, a2 e a3), os quais contêm *clusters* de resíduos de ácido aspártico e glutamina, chamados de regiões acídicas (Lenting *et al.*, 1998). Essas regiões também contêm resíduos de tirosina sulfatados, e correspondem aos resíduos 337-372 (a1) entre os domínios A1 e A2; 711-740 (a2) na ponta carboxiterminal do domínio A2 e 1649-1689 (a3) entre os domínios B e A3 (**Figura 4**).

Os três domínios A do FVIII (A1, A2 e A3) compartilham aproximadamente 40% de identidade uns com os outros e com os domínios A do fator V e da ceruloplasmina. Os dois domínios C (C1 e C2), por sua vez, também exibem aproximadamente 40% de identidade uns com os outros e com os domínios C do fator V, assim como com outras proteínas que se ligam a fosfolípidos carregados negativamente, o que sugere um papel desses domínios na interação com fosfolípidos. O domínio B, codificado pelo éxon 14, corresponde aos aminoácidos 741-1698. Ele é altamente glicosilado na porção central, e a maior parte dele pode ser deletada sem acarretar perda de atividade do FVIII (Eaton & Vehar, 1986; Pittman *et al.*, 1993). Uma característica incomum é que o domínio B é codificado por um único éxon grande e ininterrupto, e, diferentemente de outras partes da molécula do FVIII, ele não apresenta homologia de aminoácidos com outras proteínas conhecidas, incluindo o domínio B do fator V. O domínio B do FVIII divide com o fator V somente a propriedade distinta de possuir extensa glicosilação em resíduos de asparagina, serina e treonina. Ele possui 19 dos 24 sítios de asparagina potenciais para (N)-glicosilação de todo FVIII (Vehar *et al.*, 1984) e funciona como um regulador intracelular do processamento do FVIII, além de fornecer sítios de clivagem antes da secreção e durante a ativação pela trombina (Bovenschen *et al.*, 2005). A estrutura esquemática dos domínios do FVIII está representada na **Figura 4A**.

O FVIII é lançado na circulação como um heterodímero inativo de cadeia pesada (domínios A1a1A2a2-B) de 200kDa e cadeia leve (domínios a3A3C1C2) de 80kDa, associados por um íon metálico divalente. Depois de uma injúria vascular, os traços de trombina gerados na etapa de iniciação da coagulação clivam o FVIII e formam um heterotrímero de duas cadeias pesadas (domínio A1 de 50-kDa e A2 de 43-kDa) e uma leve (fragmento A3-C1-C2 de 73-kDa) (**Figura 4B**). A trombina ativa o FVIII por proteólise em

três resíduos: Arg372, Arg740 e Arg1689. Ela pode atuar numa sequência ordenada para realizar a clivagem do FVIII primeiro na Arg740, gerando um polipeptídeo de 90kDa, o que facilita as demais clivagens em Arg372, que gera os polipeptídeos de 50 e 43kDa, e em Arg1689, que gera o polipeptídeo de 73kDa (Eaton *et al.*, 1986). A clivagem no resíduo 1689 faz com que o FVIII sofra uma alteração conformacional que o libera do FvW (**Figura 4B**), abolindo a inibição da interação do FVIII com fosfolipídios (Pitmann & Kaufman, 1988) e permitindo a interação dele com as plaquetas. As subunidades A1 e A3-C1-C2 são mantidas unidas por ligações metálicas. A associação da subunidade A2 com o dímero A1/A3-C1-C2 é mediada por interações eletrostáticas e não depende de metais, sendo uma associação reversível. A presença de FVIII e FVIIIa no sangue precisa ser finamente regulada para evitar o desbalanço da hemostasia que possa promover condições patológicas.



**Figura 4. Estrutura e ativação do FVIII.** **A.** Estrutura primária do fator VIII e seus domínios. Os sítios de clivagem pela trombina são Arg 372 no sítio a1, Arg 740 no sítio a2 e Arg 1689 no sítio a3 (indicados pelas flechas). **B.** O FVIII é lançado na circulação como um heterodímero com cadeia pesada (domínios A1a1A2a2-B) e cadeia leve (domínios a3A3C1C2), associados por um íon metálico divalente. Após a clivagem proteolítica pela trombina, o FVIII é ativado e forma um heterotrímero de duas cadeias pesadas (domínio A1 de 50-kDa e A2 de 43-kDa) e uma cadeia leve (fragmento A3C1C2 de 73-kDa), e dissocia-se do fator de von Willebrand. Adaptado de Lavigne-Lissalde *et al.* (2009).

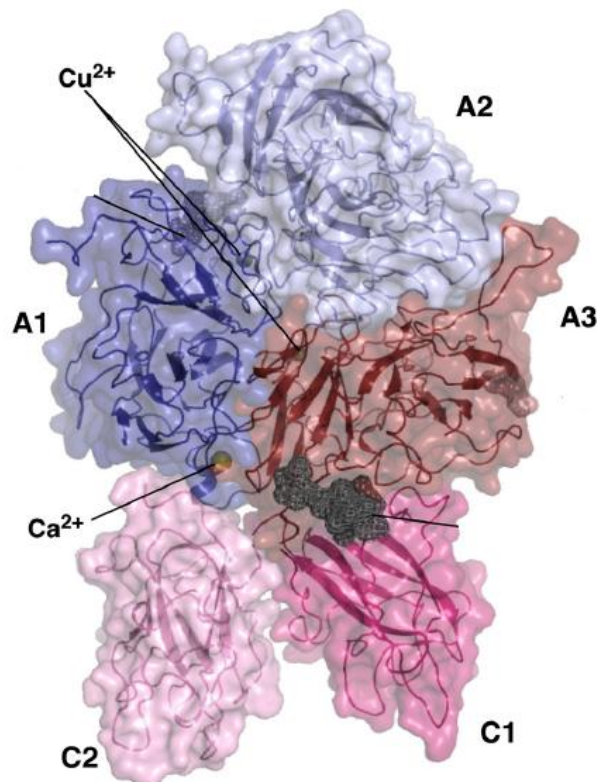
O FXa também pode ativar o FVIII, como um mecanismo de retroalimentação positivo da coagulação. O FXa cliva o FVIII da mesma forma que a trombina, nas posições 336, 372, 740 e 1689. Tem sido relatado que o FVIII ativado pelo FXa mostra menos atividade do que o FVIII ativado pela trombina (Lollar *et al.*, 1985). Isso deve ocorrer devido à clivagem adicional do FVIII na posição 336 pelo FXa.

A função e a estabilidade do FVIII dependem de íons metálicos divalentes covalentemente ligados à proteína, como o cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ), que se liga ao domínio A1 e é necessário para a atividade coagulante do FVIII; e o manganês ( $\text{Mn}^{++}$ ), que é apenas requerido para o funcionamento máximo do cofator (Celie *et al.*, 1999; Wakabayashi *et al.*, 2001). Vários estudos de mutagênese direcionada sugeriram que a região do domínio A1 entre os resíduos 110-126 constitui a região de ligação a íons cálcio (Wakabayashi *et al.*, 2004) (**Figura 5**). Essa região é em forma de laço com oito resíduos ácidos (Glu110, Glu113, Asp115, Asp116, Glu122, Glu124, Asp125 e Asp126) proporcionando um local ideal para a ligação do cálcio. Ainda, considerando a homologia estrutural do FVIII com a proteína de ligação ao cobre ceruloplasmina, não é surpreendente que os íons cobre sejam encontrados no FVIII também (Bihoreau *et al.*, 1994). Eles têm o papel de aumentar a afinidade entre os domínios em aproximadamente 100 vezes (Wakabayashi *et al.*, 2001). Já se sabe que esse íon se liga a uma rede de resíduos que compreende His/Cys/Met ou His/His/His (Nakamura *et al.*, 2007). No FVIII, dois locais ideais como estes existem dentro dos domínios A1 e A3 (**Figura 5**). Estes locais são: His267 / Cys310 / His315 / Met320 no domínio A1 e His1954 / Cys2000 / Met2010 / His2005 no domínio A3. Ainda não está claro se apenas os íons cobre estão envolvidos na associação entre as cadeias pesada e leve. Independentemente do mecanismo preciso, é evidente que os íons metálicos desempenham um importante papel na manutenção da estrutura heterodimérica do FVIII secretado.

O FVIII sem o domínio B contém cinco sítios de N-glicosilação. Estes locais estão localizados no domínio A1 (resíduos 41 e 239), A2 (resíduo 582), A3 (resíduos 1810) e C1 (resíduo 2118) (Sandberg *et al.*, 2001). Ainda há seis resíduos de tirosina que sofrem sulfatação nas posições 346 (domínio A1), 1664 e 1680 (domínio A3) e 718, 719 e 723 na extremidade C-terminal do domínio A2 (Pittman *et al.*, 1992; Severs *et al.*, 1999). A estabilidade da proteína do FVIII também depende de pontes dissulfeto, que são geralmente consideradas vitais para a estabilidade estrutural da maioria das proteínas secretadas e de membrana.

A cristalografia de raios-X de resolução intermediária determinou a estrutura do FVIII com o domínio B deletado, e Shen *et al.*, (2008) descreveram a estrutura terciária e a

organização dos domínios. Outros esforços para melhor compreender a estrutura do FVIII na ausência de dados cristalográficos foram baseados em modelagem por homologia com estruturas relacionadas ao domínio A (Pan *et al.*, 1995; Pemberton *et al.*, 1997), aos domínios C (Pellequer *et al.*, 1998), e à organização estrutural da ceruloplasmina (Zaitseva *et al.*, 1996) e do fator V inativo (Adams *et al.*, 2004). A estrutura geral do FVIII pode ser descrita como um heterotrímero triangular dos domínios A empilhados sobre dois domínios C globulares e menores. A estrutura final da molécula inclui 630 resíduos na cadeia pesada, 631 resíduos na cadeia leve, dois íons cobre, um íon cálcio e três cadeias de carboidratos. Os três domínios A formam um heterotrímero triangular em torno de um pseudo eixo de simetria, onde os domínios A1 e A3 servem de base para interagir com os domínios C2 e C1, respectivamente. A estrutura tridimensional do FVIII, com o domínio B removido, encontra-se representada na **Figura 5**.



**Figura 5. A estrutura tridimensional do FVIII com o domínio B deletado.** O domínio A1 (resíduos 1-335) e a região acídica a1 (resíduos 336-372) estão representados em azul escuro. O domínio A2 (resíduos 373-710) e a região acídica a2 (resíduos 711-740) estão representados em azul claro. Essas regiões compõem a cadeia pesada. O domínio A3 (resíduos 1690-2020), o domínio C1 (resíduos 2020-2172) e o domínio C2 (2173-2332) estão representados em vermelho, rosa escuro e rosa claro, respectivamente. A região acídica a3 é desordenada e não está incluída nessa estrutura. A estrutura contém dois íons cobre (em verde) e um íon cálcio (laranja). **Adaptado de Chi Ki Ngo *et al.* (2008).**



### 1.2.2. Síntese e Secreção do FVIII

Após a sua síntese, a proteína do FVIII é dirigida por um peptídeo sinal até o lúmen do retículo endoplasmático (RE), que serve como o local principal para o dobramento e montagem das proteínas secretadas. Ao entrar no RE, o peptídeo sinal é clivado para produzir a proteína madura de 2.332 aminoácidos, que é translocada para o lúmen do retículo endoplasmático, onde ocorrem a N-glicosilação em resíduos de asparagina e a formação de pontes dissulfeto. O domínio B é a principal região para a glicosilação, e esses carboidratos do domínio B parecem ser importantes para a secreção do FVIII (Dorner *et al.*, 1987). Esses oligossacarídeos com teor elevado de manose N-ligados do domínio B interagem com duas proteínas chaperonas: calnexina, uma proteína integral de membrana do RE, e calreticulina, uma proteína do lúmen do RE (Ellgaard & Helenius, 2003). Devido à interação com estas proteínas chaperonas, uma proporção significativa de moléculas do FVIII são retidas dentro do RE, limitando assim o transporte de FVIII para o aparelho de Golgi. As chaperonas também servem como uma parte essencial do sistema de controle de qualidade, que garante apenas a exportação de proteínas devidamente dobradas. O sistema de controle de qualidade reconhece diferenças estruturais gerais entre proteínas nativas e não-nativas e impede a secreção de proteínas não nativas que podem ser não-funcionais ou antigênicas.

Depois do dobramento correto, o FVIII prossegue em direção ao aparelho de Golgi empacotado em vesículas revestidas. Essas vesículas perdem o revestimento e se fundem umas com as outras para formar o ERGIC, um compartimento intermediário entre o retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi. Um complexo receptor específico constituído pela proteína transmembrana lectina de ligação à manose-1 (também conhecido como ERGIC-53) e de seu par de interação luminal, a proteína de deficiência de fator de coagulação múltipla 2, é necessário para este processo. O domínio B parece ser importante para as interações com esse complexo, através dos resíduos de manose N-ligados (Newell & Fay, 1995).

Uma vez no compartimento de Golgi, o FVIII está entre uma das muitas proteínas que sofre proteólise intracelular. A estrutura terciária do FVIII confere ao domínio B uma região com alta suscetibilidade à proteólise (Fowler *et al.*, 1990). Por conseguinte, o polipetídeo do FVIII é clivado no domínio B após os resíduos 1313 e 1648 para gerar a cadeia pesada de 200 kDa ligada por um íon metálico com a cadeia leve de 80 kDa. Embora o domínio B seja parcialmente clivado antes da secreção pelo Golgi, uma grande parte persiste na molécula de FVIII inativa secretada no plasma (Fowler *et al.*, 1990). Uma vez que o domínio B não contém nenhum local essencial para a coagulação, essa parte tem sido suposta como sem

função no plasma. No entanto, algumas evidências sugerem que as partes retidas do domínio B poderiam modular as interações intermoleculares do FVIII com várias moléculas e substratos durante as várias fases de sua vida útil no plasma. Dentro do aparelho de Golgi, o FVIII também sofre modificação dos oligossacarídeos N-ligados para estruturas mais complexas, O-glicosiladas, além de sofrer sulfatação de resíduos específicos de tirosina nas regiões acídicas. Essa sulfatação é importante para que a trombina reconheça os seus sítios de clivagem nessas regiões, e assim ative o FVIII. Imediatamente após a sua liberação para a circulação, o heterodímero FVIII interage com o seu transportador FvW.

### 1.2.3. Sítios de Interação do FVIII

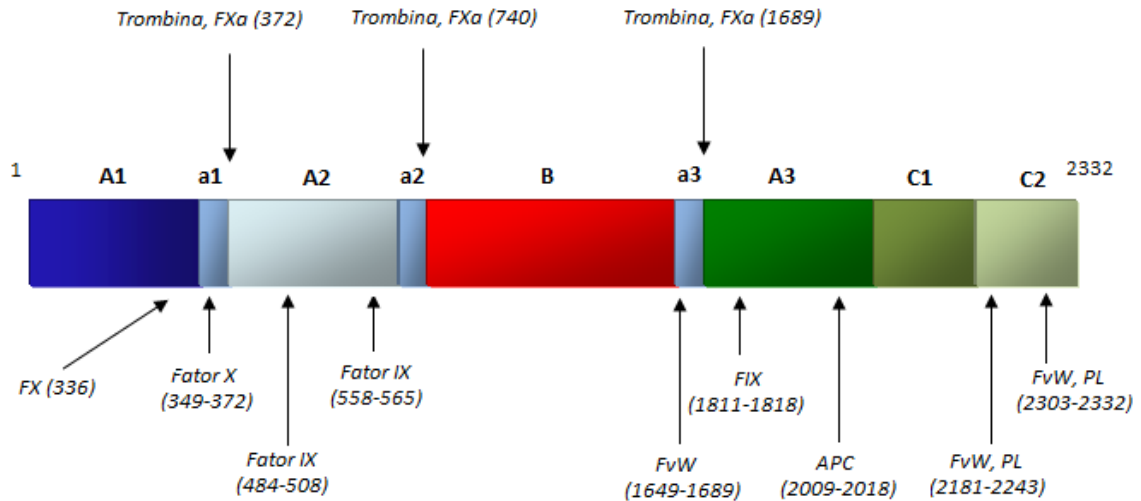
Imediatamente após a sua liberação para a circulação, a primeira interação que o heterodímero do FVIII realiza é com seu transportador FvW, para formar o complexo fortemente ligado e não covalente. Cada monômero da proteína multimérica FvW é capaz de ligar uma molécula de FVIII com alta afinidade (Lollar *et al.*, 1988; Leyte *et al.*, 1989; Vlot *et al.*, 1995; Saenko & Scandella, 1997). Quatro regiões do FVIII estão diretamente envolvidas na ligação ao FvW: uma na região aminoterminal da cadeia leve do FVIII intacto (Vlot *et al.*, 1995) nos resíduos 1.649 a 1.671, incluindo o resíduo sulfatado tirosina 1664, que é indispensável para a ligação do FvW, e duas regiões do domínio C2 (aminoácidos 2181-2243; 2303-2332) (Saenko & Scandella, 1997). Por último, o sítio de clivagem Arg1689-Ser1690 na região a3 tem que estar intacto (Saenko & Scandella, 1997), o que sugere que os resíduos 1672-1689 são críticos para mediar a interação, sendo o resíduo sulfatado tirosina 1680 de grande importância (Foster *et al.*, 1988). O FVIII complexado com o FvW é menos suscetível ao ataque proteolítico por várias proteases de ligação a lipídeos (Koedam *et al.*, 1988, 1990; Fay *et al.*, 1991a). Essas proteases dependentes de vitamina K, que incluem a proteína C ativada (APC) e o FXa, requerem o contato com o FVIII em uma superfície de membrana para a proteólise eficiente (Koedam *et al.*, 1990). Em contraste, a trombina exibe atividade proteolítica independente de uma superfície de membrana. De fato, o FvW não protege o FVIII da clivagem pela trombina (Eaton *et al.*, 1986). Outro aspecto funcional da formação do complexo FVIII-FvW é a prevenção da ligação prematura do FVIII a componentes do complexo de ativação do FX, pois a ligação da cadeia leve do FVIII ao FIXa é inibida pelo FvW (Lenting *et al.*, 1994). Mecanismos que poderiam contribuir para essa inibição incluem

impedimento estérico e alteração da conformação do FVIII para que o FIXa não possa se ligar, pois este e o FvW ligam-se em diferentes locais.

Depois de ativado, o FVIIIa é liberado de seu carreador FvW e pode participar do complexo tenase. No complexo tenase montado, o cofator FVIIIa tem atividade fornecida por três interações fundamentais: com a enzima FIXa; com membranas fosfolipídicas, e com o substrato FX. A região Ser558-Gln565 na subunidade A2 parece ser crítica para a interação FVIIIa-FIXa (Fay *et al.*, 1994; O'Brien *et al.*, 1995). Essa região é conservada e, além de ser um local de interação com o FIXa, interage com proteoglicanos heparan sulfato (Sarafanov *et al.*, 2001). Assim, o laço Ser558-Gln565 representa uma região chave de interações do FVIIIa (**Figura 6**). Substituições nessa região não afetam a estrutura secundária, mas afetam a modulação da atividade de cofator através da interação direta com o sítio ativo do FIXa. Outra região de interação com o FIXa no domínio A2 está localizada nos resíduos 484-508 (Fay & Scandella, 1999). A sequência de peptídeos de superfície na região aminoterminal do domínio A3, dos resíduos 1811-1818, parece proporcionar um sítio de ligação secundária para o FIXa (Lenting *et al.*, 1996).

Os sítios de ligação às superfícies fosfolipídicas se sobrepõem aos do FvW, só havendo ligação às primeiras quando o FvW está ausente. O efeito do fosfolípido é limitar as interações a duas dimensões, reduzindo assim o  $K_d$  para a interação FVIIIa-FIXa e o  $K_m$  para o substrato FX (Mann *et al.*, 1990). Dois sítios de ligação a fosfolípidos foram mapeados no domínio C2, nos aminoácidos 2181-2243 e 2303-2332 (Foster *et al.*, 1990; Saenko *et al.*, 1994; Healey *et al.*, 1998). A cristalografia do domínio C2 do FVIII mostra a presença de três espinhos hidrofóbicos em forma de alças formadas pelas cadeias laterais dos aminoácidos Met2199/Phe2200, Val2223 e Leu2251/Leu2252, que penetram a bicamada fosfolipídica (Pratt *et al.*, 1999; Barrow *et al.*, 2001). Além disso, quatro aminoácidos básicos (Arg2215, Arg2220, Lys2227 e Lys2249), que se encontram por baixo desses espinhos, estabilizam a interação fosfolípidos/FVIII por interação eletrostática com a carga negativa dos fosfolípidos.

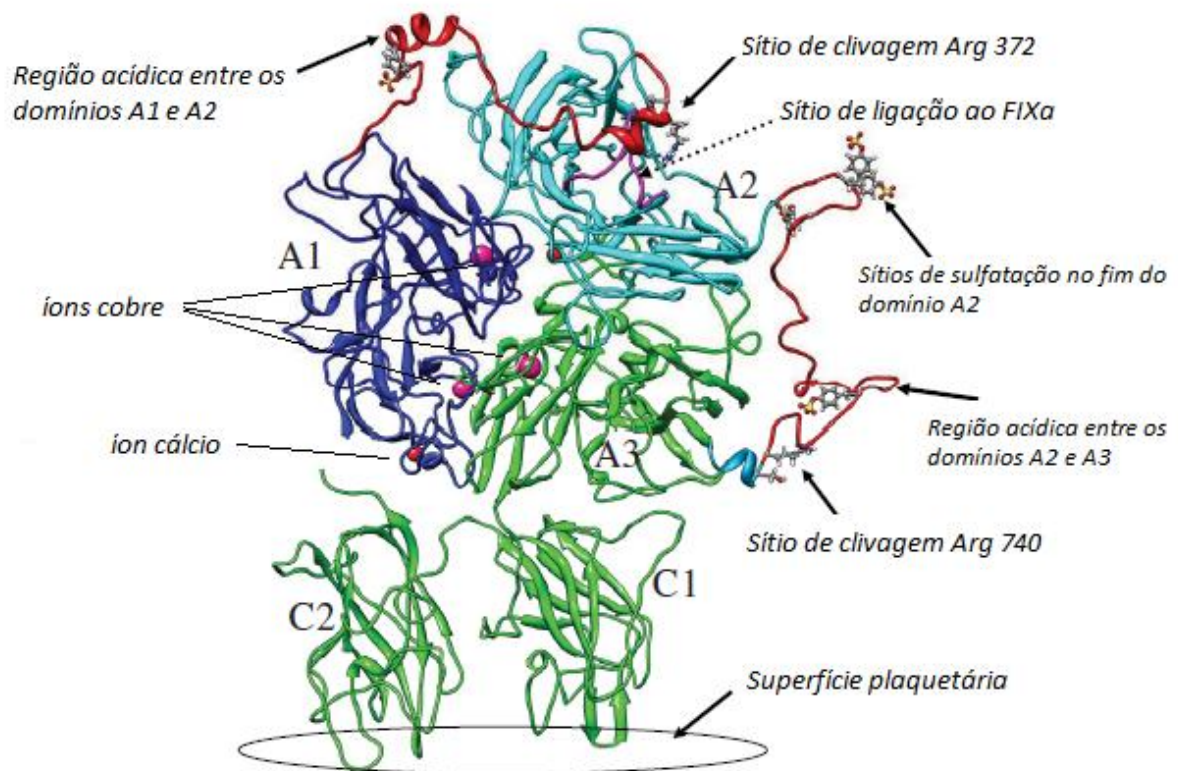
Os sítios de ligação ao substrato FX estão localizados no domínio C2 (aminoácidos 2253-2270) (Nogami *et al.*, 1999) e aminoácidos 336-372 da região a1 (Lapan & Fay, 1997). Os principais sítios de interação do FVIII estão representados na **Figura 6**. A **Figura 7** mostra os sítios de interação com os íons cálcio e cobre, bem como um esquema da interação do FVIII com a superfície plaquetária. Todos esses sítios são fundamentais para o funcionamento normal da proteína.



**Figura 6. Estrutura-função do fator VIII: principais sítios de interação do fator VIII.** No plasma, o FVIII é ligado não covalentemente ao FvW, que o protege da inativação pela proteína C ativada (APC). As regiões envolvidas na ligação do FvW estão na cadeia leve (resíduos 1649-1689 na região acídica a3; resíduos 2181-2243 e 2303-2332 no domínio C2). A APC interage com o FVIII nos resíduos 2009-2018 do domínio A3. As regiões acídicas a1 e a2 e os sítios de ligação para o fator X (FX), fator IX (FIX) e fosfolípidos de membrana (PL) também estão representados. O FVIII é ativado pela trombina e pelo FXa, com as clivagens nos sítios 372 e 740 na cadeia pesada e no resíduo 1689 na cadeia leve. O FX ainda cliva o FVIII em um sítio adicional (resíduo 336). Sítios de interação adicionais não estão representados. **Figura original.**

No que diz respeito aos locais de clivagem pela trombina nas posições 372, 740 e 1689, é notável que estes resíduos estão localizados na extremidade carboxiterminal das regiões acídicas (a1, a2 e a3), que contém vários resíduos de tirosina em uma sequência que reúne as características consenso para a sulfatação (Hortin *et al.*, 1986). Resíduos de tirosina sulfatados podem ter um papel em vários processos, incluindo interações proteína-proteína (Huttner, 1988), nesse caso a interação do FVIII com a trombina.

Por fim, as subunidades do FVIII interagem entre si. Três regiões da subunidade A2 (373-395, 418-428, e 518-533) interagem com o dímero A1/A3-C1-C2 (Lenting *et al.*, 1998). O par Arg282-Asp525 é chave para essa interação. Várias pontes de hidrogênio foram identificadas na superfície do domínio A1 que interage com o domínio A2. A interação entre as subunidades A1 e A3 é altamente estabilizada pela ligação de íons cobre na interface dos domínios, além da interação de quatro pares de aminoácidos ser fundamental para esta interação. A interação entre os domínios A2 e A3 é governada por um grande número de pontes de hidrogênio.



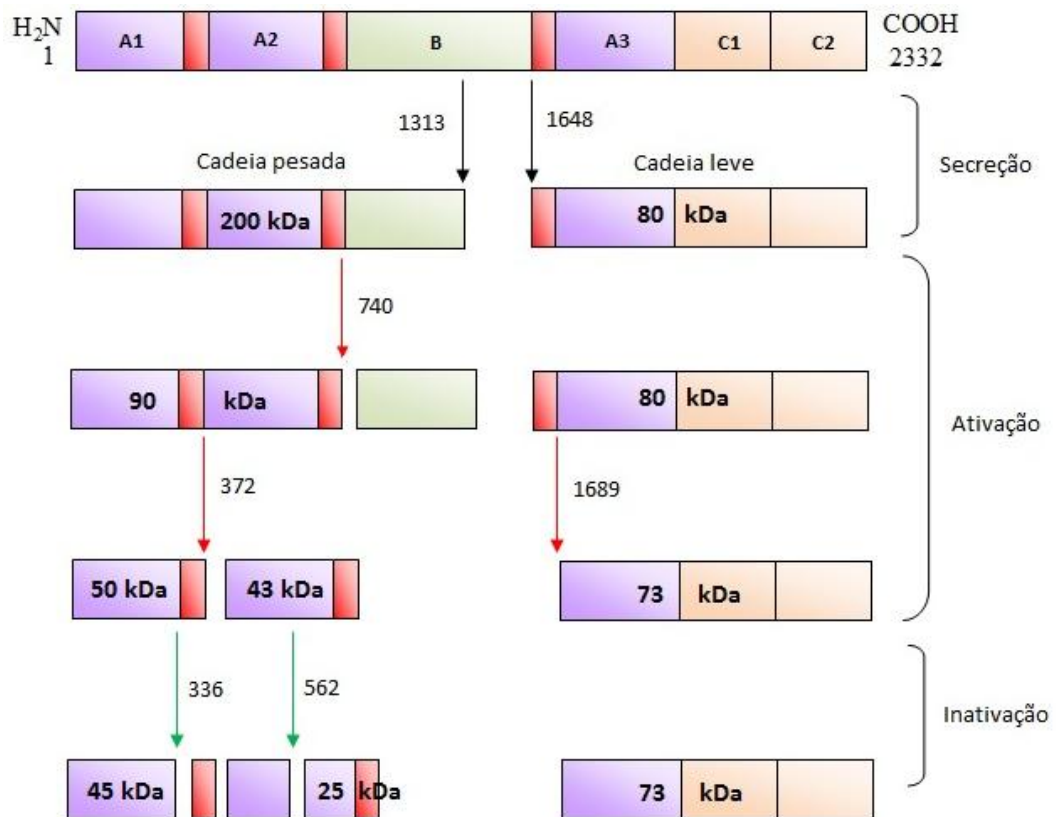
**Figura 7. Estrutura do fator VIII sem o domínio B e alguns de seus sítios de interação.** Os íons cálcio (círculos vermelhos) e cobre (círculos rosas) e os sítios de sulfatação de tirosinas estão representados. A região acídica entre os domínios A1 e A2 está bloqueando a ligação do fator IXa no domínio A2. A superfície de interação dos domínios C2 e C1 com as plaquetas está representada de maneira esquemática. **Adaptado de Venkateswarlu (2010).**

Sem a função normal do FVIII podem ocorrer sangramentos anormais. Qualquer alteração nesses sítios específicos de interação com outros fatores, íons e fosfolípidos pode acarretar mudanças na atividade da molécula do FVIII e prejudicar a coagulação. O FVIII é identificado no plasma pela sua atividade pró-coagulante (FVIII:C) ou antigênica (FVIII:Ag) (Lenting *et al.*, 1998).

#### 1.2.4. Inativação e Depuração do FVIII

A perda de atividade do complexo de ativação do FX pode envolver inativação ou inibição tanto da enzima FIXa quanto do cofator, FVIIIa. Uma vez ativado, a atividade de cofator de FVIII é rapidamente perdida (Curtis *et al.*, 1994). A instabilidade intrínseca do FVIII pode ser atribuída à fraca interação entre o domínio A2 e o dímero A1/A3-C1-C2, o

que leva à dissociação espontânea do domínio A2. A degradação proteolítica do FVIII envolve clivagens na cadeia pesada nas posições 336 e 562, efetuadas por várias enzimas, tais como FIXa, FXa e APC. A clivagem na posição 336 é feita pelos fatores IXa, Xa ou APC, e libera a região a1, a região acídica que conecta os domínios A1 e A2. Por isso, o domínio A2 se dissocia muito mais rapidamente do heterotrímero do FVIII (Fay *et al.*, 1993). Além disso, essa região acídica espaçadora parece conter um sítio de ligação para o substrato FX (Lapan & Fay, 1997), indicando que a liberação dessa região prejudica a ligação ao substrato. Assim, a clivagem em Arg336 afeta tanto as interações intramoleculares (dissociação do domínio A2) quanto intermoleculares (interação fator VIII-fator X). A Arg562, que é parte da sequência do domínio A2 que interage com o FIXa, é exclusivamente clivada pela APC (Fay *et al.*, 1991b). Desse modo, o FIXa desempenha um duplo papel, pois ele estabiliza o FVIII, vinculando o domínio A2 e o domínio A3, assim como o protege contra a inativação pela APC. Por outro lado, sob certas condições, o FIXa pode inativar o FVIIIa por clivagem na posição 336, um sítio que é compartilhado com o FXa e APC. Não se sabe qual dos mecanismos é predominante na inativação do FVIII. Apesar da proteína C ativada ter maior afinidade pela arginina 336 (Regan *et al.*, 1996), a clivagem somente nesse sítio não inativa completamente o FVIIIa. De fato, a clivagem na arginina 562 é requerida para a completa inativação do cofator (Gale *et al.*, 2008). Entre as proteínas que formam o complexo tenase, o FVIII é o alvo preferencial para a regulação, porque ele é o responsável pelo aumento drástico da atividade do complexo. A **Figura 8** representa esquematicamente o ciclo de vida da molécula do FVIII, desde a sua secreção, passando pela ativação e finalizando em sua inativação.



**Figura 8. O ciclo de vida do FVIII.** O FVIII é produzido como um peptídeo maduro de 2332 aminoácidos, o qual é por sua vez clivado no aparelho de Golgi em seu domínio B nas posições 1313 e 1648, e então secretado no plasma. A trombina e o FXa ativam o FVIII através de clivagens subsequentes (primeiro na posição 740 e em seguida nas posições 372 e 1689), representadas por flechas vermelhas. A principal molécula inativadora do FVIII é a proteína C ativada (APC) que cliva o FVIII nas posições 336 e 562, indicadas por flechas verdes. A clivagem pela APC na posição 562 do domínio A2 leva à perda do sítio de interação do FVIII com o FIXa e consequentemente à perda da sua função de cofator. Estão representados somente os principais mecanismos de ativação e inativação. **Figura original.**

Após a inativação do FVIII, ele precisa ser depurado do plasma. Evidências sugerem que as estruturas de oligossacarídeos N-ligados ao domínio B podem desempenhar um papel nessa depuração (Bovenschen *et al.*, 2005). A *low-density lipoprotein receptor-related protein* (LRP), um receptor endocítico, parece remover o FVIII da circulação (Bovenschen *et al.*, 2003). Essa proteína, um membro da família dos receptores da lipoproteína de baixa densidade, é responsável pela depuração plasmática dos remanescentes de lipoproteínas, serina proteinases e seus complexos com inibidores (serpinas) (Strickland *et al.*, 1995). Além do FVIII, LRP medeia a depuração de um certo número de outras proteínas envolvidas na coagulação do sangue e fibrinólise, tais como os fatores IXa (Neels *et al.*, 2000) e Xa (Narita *et al.*, 1998), ativadores do plasminogênio e seus complexos com inibidores deste ativador

(Herz *et al.*, 1992). A endocitose mediada por LRP é facilitada pelos proteoglicanos de superfície celular heparan sulfatos, que são componentes da matriz extracelular. Foi demonstrado que a região do domínio A3 Glu1811-Lys1818 da cadeia leve do FVIII está envolvida na interação com a LRP (Bovenschen *et al.*, 2003). Descobriu-se que o FvW compete com a LRP pela ligação ao FVIII (Lenting *et al.* 1999), o que é compatível com a noção de que o FvW protege o FVIII da sua degradação prematura no plasma. Por outro lado, Saenko *et al.* (1999) demonstraram que a região Arg484-Phe509 dentro do domínio A2 da cadeia pesada do FVIII também contém uma região de interação à LRP. Este sítio é críptico e exposto somente quando o FVIII é ativado. Outros mecanismos também desempenham um papel. Um candidato potencial é o receptor asialoglicoproteína, um membro da família das lectinas abundantemente expresso no fígado e envolvido na ligação e captura endocítica de glicoproteínas da circulação (Bovenschen *et al.*, 2005).

### **1.3. Hemofilia A**

A hemofilia A (HA) é uma doença hemorrágica causada pela redução da atividade e/ou quantidade do FVIII da coagulação, devido a alterações no gene F8 (Gitscheir *et al.*, 1984). A ausência ou diminuição da atividade do FVIII endógeno dificulta a amplificação na geração de trombina necessária para a consolidação do coágulo de fibrina, causando a falha no reparo da lesão endotelial. A partir do modelo clássico da cascata de coagulação, não se explica porque a via extrínseca é incapaz de produzir quantidades suficientes de FX para, pelo menos parcialmente, compensar a deficiência de FVIII. Porém, o modelo celular da coagulação facilita a compreensão da fisiopatologia e dos mecanismos que levam à hemofilia A. Ele não sugere que a geração de FXa pelo complexo TF/FVIIa é insuficiente na hemofilia, mas que ocorre na superfície da célula errada (em células carreadoras de FT ao invés das plaquetas), sendo que o FXa gerado nas células carreadoras de FT é pontentemente degradado por inibidores plasmáticos antes de conseguir chegar à superfície plaquetária, explicando a deficiência na coagulação causada pela redução da atividade do FVIII. O padrão de herança da hemofilia A é recessivo ligado ao X e afeta aproximadamente 1 em cada 5000 nascimentos masculinos (Kazazian *et al.*, 1995). A sua incidência não varia muito entre as diferentes populações. No Rio Grande do Sul, a prevalência estimada é de 1:11.700 homens (Alexandre & Roisenberg, 1985).



### 1.3.1. Sintomatologia e Diagnóstico da Hemofilia A

Segundo a Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia, as diferentes alterações no gene F8 resultam em três diferentes categorias de hemofilia A, que variam nas características clínicas apresentadas e na quantidade de FVIII produzida: hemofilia A grave, quando o nível de FVIII no plasma do paciente é  $< 1\%$  do que o FVIII encontrado no plasma de um indivíduo normal, hemofilia A moderada (1-5%) ou hemofilia A leve (5-40%) (White *et al.*, 2001).

A sintomatologia, caracterizada por sangramentos, depende da atividade de FVIII residual no plasma. Os hemofílicos graves apresentam sangramentos espontâneos ou após traumas leves; os moderados apresentam sangramentos importantes após pequenos traumas, enquanto que a maioria das formas leves apenas manifestam a doença após traumatismos fortes ou intervenções cirúrgicas (Tuddenham & Copper, 1994). As hemorragias podem ocorrer sob as formas de hematúria, epistaxe, melena/hematêmese ou se apresentarem como hematomas, sangramentos retroperitoniais, intra-articulares e até mesmo intracranianos, sendo os últimos aspectos mais característicos da forma grave da doença (Gilbert, 1981). Pacientes graves, na ausência de tratamento profilático, apresentam de dois a cinco episódios de sangramentos espontâneos por mês, que podem levar à morte por perda excessiva de sangue se não contidos. Foram descritos relatos de casos de complicações raras associadas com o sangramento agudo na hemofilia, incluindo ruptura esplênica (Samaiya *et al.*, 2001), gangrena gasosa (Ghosh *et al.*, 1999), e hemorragia da medula espinhal cervical (Ghosh *et al.*, 2001). O sangramento agudo no compartimento osteofacial pode causar graves problemas neurológicos. Quanto aos sangramentos crônicos, a artropatia hemofílica crônica como consequência da hemorragia repetida nas articulações pode levar ao desenvolvimento de pseudocistos ou pseudotumores com efeitos localmente destrutivos sobre os ossos, músculos e nervos, causando neuropatia compressiva crônica. Cerca de 50% dos indivíduos afetados são hemofílicos graves, enquanto os moderados e leves ocorrem nas frequências de 30% e 20%, respectivamente (Antonarakis *et al.*, 1995).

O diagnóstico da hemofilia A é realizado através da observação dos sintomas acima citados e da execução dos testes de triagem da cascata de coagulação (TP e TTPA), assim como a dosagem do FVIII e do FvW no plasma dos pacientes. O FVIII pode ser dosado no plasma de forma quantitativa por métodos que detectam o antígeno do FVIII (FVIII:Ag); ou de forma qualitativa, que mede a atividade coagulante do FVIII (FVIII:C). Utilizando-se dos conceitos de via intrínseca e extrínseca, ainda empregados para análises laboratoriais, os

hemofílicos A apresentam o TTPA aumentado, pois ele mede a atividade *in vitro* da via intrínseca de coagulação, enquanto o TP, que mede a atividade da via extrínseca, encontra-se normal. Os níveis de FVIII:C são baixos e os de FvW são normais. Na hemofilia A grave, o diagnóstico muitas vezes acompanha a observação de graves feridas ou hemorragias inexplicáveis em homens jovens, frequentemente presentes em torno de um ano de idade, quando as crianças tornam-se móveis (Goodeve, 2010). A história familiar da doença também é um indicador de referência para o diagnóstico. No entanto, cerca de um terço dos casos não têm história prévia de hemofilia A na família (doença esporádica). Nos casos de história familiar positiva, podem ser realizados testes pré-natais em fetos masculinos para estabelecer o diagnóstico de hemofilia A, embora esse procedimento não seja de uso corrente.

A doença de von Willebrand do tipo 2N pode causar confusão no diagnóstico da hemofilia A. Existem três tipos de doença de von Willebrand: tipo 1 (deficiência quantitativa parcial de FvW); tipo 2 (deficiência qualitativa no FvW) e tipo 3 (deficiência quantitativa total de FvW). A doença de von Willebrand é causada por alterações no gene que codifica para esse fator. Como já citado, o FvW é responsável por proteger o FVIII da degradação prematura na circulação. Assim, se o FvW está diminuído ou com alguma alteração funcional, os níveis de FVIII no plasma também irão diminuir. No subtipo 2N da doença, que possui padrão de herança autossômico recessivo, ocorrem mutações nos domínios do FvW que interagem com o FVIII, acarretando a perda da interação e conseqüentemente a degradação prematura do FVIII na circulação. Como a alteração é qualitativa, não quantitativa, os níveis de FvW no plasma estão normais, e os de FVIII baixos pela falta de proteção, gerando um diagnóstico que pode ser confundido com o de hemofilia A (Mazurier *et al.*, 1990). As duas doenças podem ser discriminadas por um teste que determina a ligação do FvW ao FVIII (Nesbitt *et al.*, 1996), pela genotipagem do sítio de ligação do FVIII no FvW, ou genotipagem do FVIII. Essas abordagens podem também ser utilizadas quando a deficiência de FVIII não mostra herança clara ligada ao X.

### **1.3.2. O Tratamento da Hemofilia A**

Entre os anos 1950 e início dos anos 1960, os hemofílicos eram tratados apenas com sangue total ou plasma fresco. Infelizmente, nestes produtos não há FVIII suficiente para conter uma hemorragia grave. Assim, a maioria das pessoas com hemofilia A grave morriam na infância ou no início da idade adulta, sendo que hemorragias após cirurgias ou em órgãos

vitais (especialmente no cérebro) eram as causas mais comuns de morte (Manucci, 2008). Em 1964, a descoberta de que o crioprecipitado obtido a partir de um *pool* de plasmas continha grandes quantidades de FVIII representou um enorme passo no tratamento da hemofilia A. Pela primeira vez, o FVIII podia ser infundido em volumes relativamente pequenos para controlar hemorragias graves, e grandes cirurgias tornaram-se viáveis (Manucci, 2002). O tratamento da hemofilia A continuou a evoluir na década de 1970, quando houve o aumento da disponibilidade de plasma liofilizado e de concentrados de fatores de coagulação, junto com a adoção da terapia de reposição em casa, o que levou ao controle precoce de hemorragias e à redução dos danos músculo-esqueléticos típicos de pacientes com tratamento inadequado.

Apesar da melhora, esta percepção otimista da hemofilia mudou dramaticamente no início de 1980, quando 60-70% dos indivíduos com doença grave foram infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), que tinha contaminado os concentrados de fatores de coagulação fabricados a partir de *pools* de plasma de milhares de doadores. Quase todos os hemofílicos tratados foram também infectados com o vírus da hepatite C (Manucci, 2003).

Com as epidemias e sequelas da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e hepatite C, a necessidade de um tratamento seguro tornou-se essencial para os hemofílicos. O desenvolvimento e a aplicação de técnicas de inativação viral para a produção de concentrados de fatores derivados de plasma, bem como a adoção de novos métodos de triagem na doação de sangue, melhoraram muito a segurança dos produtos derivados de plasma. No entanto, o avanço mais importante nesse campo foi representado pelo progresso rápido na tecnologia do DNA recombinante (clonagem em 1984 do F8), que permitiu a produção industrial de FVIII recombinante, culminando com a publicação, em 1989, do primeiro relatório de eficácia clínica deste produto em dois pacientes com hemofilia A.

O FVIII recombinante é produzido utilizando células de mamíferos, como células de rim de filhotes de hamster ou células de ovário de hamster chinês. Ele é uma glicoproteína altamente purificada e fornece uma terapia de reposição temporária para prevenir ou controlar episódios de sangramento, realizar cirurgias de emergência ou eletivas. Ele tornou-se disponível a partir de 1992, passando a ser o tratamento de escolha se disponível e acessível, uma vez que elimina os riscos de transmissão de agentes infecciosos. As metodologias de produção do FVIII recombinante evoluíram cada vez mais, levando ao surgimento de produtos de segunda geração (alta pureza) e terceira geração (ultra-alta pureza).

A elucidação da estrutura, função e via de secreção do FVIII tem fornecido importantes contribuições para o desenvolvimento do FVIII recombinante, com maior eficiência de

secreção em sistemas heterológos. Uma vez que o domínio B do FVIII é considerado dispensável para a sua atividade (Toole *et al.*, 1986), foi desenvolvido um FVIII com domínio B deletado (BDD)-FVIII, que resultou num aumento de 17 vezes nos níveis de RNAm, mas apenas um aumento modesto de 30% na secreção da proteína, sugerindo que podem existir outras limitações intracelulares (Pittman *et al.*, 1993). Algumas das áreas inexploradas da estrutura do FVIII em uma perspectiva de bioengenharia incluem as modificações pós-traducionais, tais como a N-glicosilação de resíduos de asparagina fora do domínio B, O-glicosilação, formação de pontes dissulfeto, entre outras.

Atualmente, a base do tratamento é aumentar a concentração do FVIII no plasma do paciente em quantidades suficientes para evitar hemorragias espontâneas e traumáticas ou para cobrir cirurgias. A concentração de FVIII pode ser elevada de forma eficaz em hemofílicos A leves pelo uso de desmopressina, um análogo do hormônio antidiurético (Manucci, 2000). A desmopressina tem um efeito que dura 24 horas após uma única dose e pode induzir a hiponatremia, especialmente em crianças. Ela deve ser usada sempre que possível, não só para evitar o alto custo dos concentrados de FVIII mas também para minimizar a exposição ao FVIII exógeno. Entretanto, alguns pacientes leves deixam de responder a esse fármaco ou necessitam de intervenções cirúrgicas, tendo então que aderir à reposição de FVIII.

O uso de crioprecipitado foi proibido em 2002 no Brasil. Dessa forma, o tratamento clássico dos pacientes com todas as formas da doença envolve a terapia de reposição do FVIII, utilizando-se preparações derivadas de plasma humano, como o FVIII purificado, que contém o FvW, ou o obtido por técnicas de DNA recombinante, mais seguros (Rezende *et al.*, 2009). Alguns concentrados de plasma são destinados para o uso doméstico e podem ser auto-administrados, seja regularmente para prevenir o sangramento, ou no primeiro sinal de sangramento. Porém, existe uma dificuldade na manutenção de níveis adequados de FVIII no plasma, para proteger contra hemorragias, pois sua meia-vida (10-12h) é baixa e é necessária a administração do FVIII a cada 2-3 dias (Oldenburg *et al.*, 2009). Assim, o tratamento deve ser administrado periodicamente para evitar hemorragias (profilaxia), e é essa estratégia recomendada para crianças com HA grave.

Outra dificuldade do tratamento é o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes, chamados inibidores, contra o fator de coagulação exógeno administrado (Rieger, 1996). Estes inibidores tornam as terapias de substituição clássicas ineficazes. Terapias alternativas para sangramentos agudos em pacientes com inibidores incluem o FVIII porcino, ou a administração de altas doses de FVIII humano e remoção do anticorpo por imunoabsorção ou plasmaferese, seguido de infusão desse fator (Kempton & White, 2009). Outra possibilidade é

o tratamento com produtos de desvio (“*bypass*”), que produzem a hemostasia através da eliminação do passo dependente do FVIII e do fortalecimento da geração de trombina (Goudemand, 1999; Carlsson *et al.*, 2008). Dois desses tratamentos (concentrado do complexo de protrombina ativado, aPCC, e Fator Recombinante VIIa, rFVIIa) vêm sendo utilizados, inclusive no Brasil, mas há discussão sobre o custo-benefício de cada um (Goudemand, 1999; Ozello *et al.*, 2007; Carlsson *et al.*, 2008).

Como existe a complicação de desenvolvimento de inibidores na hemofilia A, a doença vem sendo um dos principais alvos de terapias gênicas moleculares. A terapia ideal envolveria a reparação da mutação que causa a doença, para então permitir que o gene reparado seja expresso sob o controle de seus elementos regulatórios normais (Lillicrap *et al.*, 2006). Vários protocolos já foram desenvolvidos, mas ainda nenhum obteve o resultado desejado.

Todos esses desenvolvimentos e tecnologias utilizadas no tratamento da hemofilia A resultaram no aumento da qualidade de vida, saúde e expectativa de vida nos doentes, que começaram a passar a transição da infância para a idade adulta com articulações saudáveis e um bom estado geral. Devido ao aumento da expectativa de vida, esses pacientes passaram a experimentar problemas clínicos relacionados com a idade que não tinham sido previamente observados. Assim, o atendimento especializado para hemofílicos foi estendido para pacientes com idades mais avançadas, incluindo cuidados geriátricos.

De 1900 a 1942, a expectativa de vida entre os pacientes graves na Suécia era de 16,5 anos, em contraste com os 29 anos para os que tinham a doença leve (Ramgren, 1962). Já durante o período de 1960-1980, a expectativa de vida na Suécia tinha aumentado para 72 anos em pacientes com hemofilia A leve, em comparação com 75,5 anos na população normal (Larsson, 1984). Atualmente, a expectativa de vida nesse país se mantém semelhante à da população normal. Essa realidade é diferente em países emergentes como o Brasil, onde muitos pacientes ainda não têm acesso ao tratamento adequado. Em todo o mundo existem cerca de meio milhão de pessoas com hemofilia, menos de um terço dos quais são diagnosticados. A prevalência da hemofilia A varia consideravelmente entre os países, mesmo entre os mais ricos. A prevalência (por 100.000 homens) em países de alta renda foi de  $12,8 \pm 6,0$  (média  $\pm$  DP) ao passo que é de  $6,6 \pm 4,8$  para o resto do mundo (Stonebraker *et al.*, 2010). No Brasil, o Ministério da Saúde é responsável pela aquisição e distribuição de concentrados de FVIII para os centros de tratamento da hemofilia espalhados por todo o país, mas, até agora, o Brasil não possui a tecnologia para produzir fatores concentrados e é, portanto, totalmente dependente de produtos importados.

### 1.3.3. Complicações do Tratamento: A Formação de Inibidores anti-FVIII

Como já mencionado, uma das complicações mais sérias no tratamento de hemofílicos é o desenvolvimento de anticorpos (inibidores) contra o FVIII. Esses inibidores tornarão o tratamento ineficaz (Scandella *et al.*, 1993). A incidência de inibidores em diferentes populações de hemofílicos A é muito ampla, variando de 7 a 30% (Lusher *et al.*, 1993), sendo que no Brasil ela foi estimada em torno de 20% (Rieger & Roisenberg, 1999), considerando os pacientes com todas as formas de hemofilia A (grave, moderada e leve). Nos pacientes graves, a frequência de inibidores situa-se em geral entre 25-30% (Hoyer, 1995). No Rio Grande do Sul a incidência de inibidores nos hemofílicos graves é de 40% (Leiria *et al.*, 2009). Quanto aos pacientes leves e moderados, vários estudos indicam que o desenvolvimento de inibidores é um evento raro, ocorrendo em 3-13% dos pacientes (Rizza & Spooner, 1983; McMillan *et al.*, 1988; Sultan, 1992; Sharathkumar *et al.*, 2003), não havendo até agora estudos sobre a incidência de inibidores nesses pacientes no Rio Grande do Sul.

Tanto fatores genéticos quanto não-genéticos influenciam a suscetibilidade dos pacientes em desenvolver inibidores. Entre os fatores genéticos, o tipo de mutação do F8, a etnia, a história familiar quanto a inibidores, o genótipo HLA e polimorfismos em genes de citocinas parecem estar envolvidos. Características do tratamento (tipo e pureza do concentrado de FVIII utilizado), idade de início do tratamento, doses iniciais de concentrado, cirurgias, frequência de infusões antes do desenvolvimento de inibidores, intensidade do tratamento e infecções associadas estão entre os fatores não-genéticos (Zhang *et al.*, 2009).

O tipo de mutação no F8 é o fator intrínseco que possivelmente mais influencia no desenvolvimento de inibidores. Geralmente, mutações que resultam na ausência ou truncamento da proteína do FVIII estão associadas com a incidência maior de formação de inibidores (Fakharzadeh & Kazazian, 2000). Essas mutações incluem as inversões dos introns 1 e 22, grandes deleções e mutações sem sentido (Astermark, 2006), que são mais frequentes em pacientes graves. A incidência deve ser menor em pacientes cuja mutação do F8 ainda permite que certa quantidade de FVIII esteja presente na circulação (Zhang *et al.*, 2009). Mutações de sentido trocado, pequenas deleções e mutações em sítios de processamento de RNAm são consideradas de baixo risco para o desenvolvimento de inibidores, e essas mutações estão geralmente relacionadas aos fenótipos leve e moderado (Tuddenham & Mcvey, 1998). Apesar do baixo risco, algumas mutações desse tipo contribuem para a incidência inesperada de inibidores em pacientes leves e moderados. Essas mutações são principalmente localizadas em éxons que codificam a cadeia leve (Oldenburg *et al.*, 2002).

Assim como em pacientes graves, uma predisposição familiar a desenvolver inibidores pode existir nesses pacientes (Astermark *et al.*, 2001).

O genótipo do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) do paciente também proporciona uma variação individual na suscetibilidade ao desenvolvimento de inibidores. Em estudos realizados com pacientes hemofílicos A e com inversão do intron 22, alelos do MHC classe I A3, B7 e C7 e alelos do MHC classe II DQA0102, DQB0602 e DRB1501 foram mais frequentemente encontrados em pacientes com inibidores (Oldenburg *et al.*, 1997; Hay *et al.*, 1997). Outra fonte de variabilidade é o repertório de células T presentes em um indivíduo. Além dessas, polimorfismos em genes que levam a uma função alterada de citocinas ou seus receptores também podem causar um desequilíbrio da resposta imune, como, por exemplo, polimorfismos em genes do CTLA-4, interleucina (IL)-4, IL-5, IL-10, IL-6 e TNF- $\alpha$  que foram analisados em alguns estudos para verificar sua relação com o desenvolvimento de inibidores. Astermark (2006) estudou um polimorfismo na região promotora do gene da IL-10 (alelo 134) e encontrou grande associação com a formação de inibidores. Uma forte ligação entre polimorfismos no gene do TNF- $\alpha$  e o desenvolvimento de inibidores em irmãos hemofílicos também foi encontrada no estudo MIBS (*Malmö International Brother Study group*) (Astermark *et al.*, 2001). Os polimorfismos -819C>T e -592 C>A no gene da IL-10 foram associados com o desenvolvimento de inibidores em uma população de hemofílicos A graves do Rio grande do Sul (Agostini *et al.*, 2012).

A maioria, mas não todos os indivíduos que desenvolvem anticorpos anti-FVIII o fazem no início da vida, após um número médio de 9-12 tratamentos com o fator exógeno. Entretanto, não há nenhuma idade provável ou número de tratamentos realizados que tornam um indivíduo completamente seguro ao risco de desenvolver inibidores (Salviato *et al.*, 2007). Quando há suspeita de desenvolvimento de inibidores em um paciente, ele deve ser testado utilizando o ensaio Bethesda para inibidor (*Bethesda inhibitor assay* - BIA). Recomenda-se a realização do teste em intervalos regulares durante os primeiros 50 dias de tratamento, que é o período de maior risco. Passadas as primeiras infusões, recomendam-se testes anuais (Kempton & White, 2009).

#### **1.4. Mutações no F8 e a Hemofilia A**

A hemofilia A é uma doença com grande heterogeneidade clínica, devido em grande parte à enorme variedade de mutações descritas no F8. Vários tipos de mutações em todos os éxons do FVIII já foram descritas como causadoras de HA, além de mutações em íntrons.

Dependendo da mutação, a gravidade e a resposta ao tratamento são diferentes. Mutações sem sentido, em sítios de processamento do RNAm, de sentido trocado, inversões e grandes deleções são responsáveis pela doença em pacientes graves (Riccardi *et al.*, 2010). A inversão do íntron 22 é responsável por aproximadamente 30-50% dos pacientes graves afetados: o gene é invertido, como resultado de uma recombinação homóloga intracromossômica entre uma cópia de uma sequência de 9,5Kb conhecida como *int22h-1* e uma de duas outras regiões homólogas teloméricas (*int22h-2* e *int22h-3*) (Lakich *et al.*, 1993). Outra mutação recorrente, que ocorre em 2-5% dos pacientes graves, é baseada em um mecanismo similar no íntron 1, onde uma cópia de 1Kb *int1h-1* pode recombinar com uma região homóloga extragênica, levando à ruptura do gene pela inversão e separação do éxon 1 do resto do gene (Bagnall *et al.*, 2002). No Rio Grande do Sul, as frequências encontradas foram de 42,9% para a inversão do íntron 22 e 2,8% para a inversão do íntron 1 (Leiria *et al.*, 2009). Não há registros dessas duas inversões em hemofílicos com formas moderadas ou leves (Rossetti *et al.*, 2004). Geralmente, fenótipos leves e moderados resultam de mutações de sentido trocado, mutações no promotor, mutações em sítios de processamento de RNAm, pequenas deleções ou duplicação do éxon 13 (Riccardi *et al.*, 2010).

De acordo com o banco de dados *online* de hemofilia A, *Haemophilia A Mutation Database* (HAMSTeRS, 2012), existem 1.215 mutações que resultam em hemofilia A nas formas grave, moderada ou leve. Além das inversões dos introns 1 e 22, já citadas, o banco de dados inclui mutações pontuais, das quais 58% resultam na mudança de um aminoácido da sequência original (mutação de sentido trocado), 13% levam à criação de códons de parada, e 10% dão origem a um processamento do RNAm alterado ou ausente. Também, neste banco de dados, existem 135 grandes deleções (acima de 50pb) descritas; o mecanismo de sua formação é provavelmente a recombinação não-homóloga, e elas são responsáveis por cerca de 5% dos casos de HA grave e poucos casos de HA moderada. As pequenas deleções (50pb ou menos) têm papel mais importante na patologia das formas menos graves da doença, e há registro no banco de dados de 14 diferentes pequenas deleções em casos leves e moderados. Além disso, foram descritas 80 diferentes inserções associadas com o tipo grave e 6 inserções associadas com os tipos leve e moderado da doença. Também estão relacionadas com os fenótipos leves e moderados algumas mutações de sentido trocado descritas nos introns 1, 4, 6, 11, 12, 14, 16, 18, 24 e 26.

A **Tabela 1** mostra as frequências de distribuição das mutações entre os 26 éxons do F8 em hemofílicos A leves e moderados. Como podemos observar, as mutações de ponto são responsáveis por 95% das causadoras da doença, sendo que o maior número delas ocorre no



éxon 14, que é porém desproporcionalmente o de maior tamanho em pares de bases (3106). Esse éxon possui muitas regiões repetidas de adenina propensas a mutações. Ele codifica o domínio B do FVIII, que está ausente na proteína madura, mas possui função importante na sua biossíntese e transporte. Proporcionalmente, é o que apresenta a menor frequência de mutações (1%). Considerando-se todos os éxons a frequência média de mutações observadas é de 6.5%. Vinte e um dos 26 éxons apresentam valores mais elevados, com os éxons 18 (183pb), 23 (145pb) e 5 (69pb) mostrando frequências de respectivamente 17%, 19% e 20%. Esses três éxons possuem algumas pequenas regiões de repetições de adenina e timina que podem ser propensas a mutações, mas nenhuma característica especial que possa explicar os valores mais elevados observados. As pequenas deleções são responsáveis por 3,0% da doença e as inserções por 2,0%. As duplicações não estão representadas na tabela, sendo que a duplicação do éxon 13 já foi encontrada em pacientes leves (Acquila *et al.*, 2004).

**Tabela 1.** Distribuição das mutações já descritas entre os 26 éxons do FVIII em pacientes leves e moderados.

Éxon	Tamanho (pb)	Mut. de ponto de sentido trocado	Mut. de ponto sem sentido	Mut. de ponto em sítios de processamento	Pequenas deleções	Inserções	Total	
							N	%
<b>1</b>	143	6	1	2	0	0	9	6
<b>2</b>	122	2	0	0	1	0	3	2
<b>3</b>	123	14	0	1	0	0	15	12
<b>4</b>	213	23	1	3	0	1	28	13
<b>5</b>	69	11	0	2	1	0	14	20
<b>6</b>	117	3	1	3	0	0	7	6
<b>7</b>	222	30	0	1	1	0	32	14
<b>8</b>	262	17	0	0	1	0	18	7
<b>9</b>	172	16	0	4	0	0	20	12
<b>10</b>	94	10	0	0	0	0	10	11
<b>11</b>	215	25	1	2	0	0	28	13
<b>12</b>	151	9	1	2	0	0	12	8
<b>13</b>	210	24	0	1	0	1	26	12
<b>14</b>	3106	26	2	3	3	4	38	1
<b>15</b>	154	14	0	0	2	0	16	10
<b>16</b>	213	21	1	1	0	0	23	11
<b>17</b>	229	14	0	0	1	1	16	7
<b>18</b>	183	30	1	0	1	0	32	17
<b>19</b>	117	11	0	1	0	1	13	11
<b>20</b>	72	5	0	0	0	0	5	7
<b>21</b>	86	5	0	0	0	0	5	6
<b>22</b>	156	13	0	1	0	0	14	9
<b>23</b>	145	28	0	0	0	0	28	19
<b>24</b>	149	9	1	3	2	0	15	10
<b>25</b>	177	10	0	1	0	1	12	7
<b>26</b>	156	19	2	0	1	0	22	14
<b>Total</b>	7056	395	12	31	14	9	461	6,5
<b>%</b>	-	85,7	2,6	6,7	3,0	2,0	100	-

Fonte: HAMSTERS (2012).

Os efeitos das mutações no F8 podem ser (1) espaciais, causando torções em segmentos de cadeias da proteína ou introduzindo impedimento estérico entre resíduos adjacentes; ou (2) criando novas ou destruindo pontes de hidrogênio, pontes dissulfeto ou ligações iônicas (Ma *et al.*, 2008). Esses efeitos podem afetar as ligações internas entre os domínios da molécula ou com outros fatores, como FvW, FIXa, FXa ou com os fosfolipídios; podem causar discrepâncias entre os ensaios de um estágio e de dois estágios na dosagem de FVIII:C; podem afetar a ativação pela trombina; e podem modificar o processamento proteolítico da proteína, o dobramento correto, as modificações pós-traducionais ou a secreção. Todos esses efeitos são causados por alterações que ocorrem nos sítios de interação com as outras moléculas ou em sítios próximos a eles.

O papel da interação FVIII-FvW para estabilizar o FVIII no plasma, aumentando a sua meia-vida e reduzindo sua depuração está bem descrito. Por conseguinte, mutações de sentido trocado que rompem esta interação podem conduzir à hemofilia. Estas mutações foram identificadas principalmente nos domínios C1 e C2 e podem alterar a estrutura do núcleo destes domínios ou perturbar sítios de interação da superfície (Liu *et al.*, 2000). Em particular, aglomerados distintos de resíduos foram identificados como perturbadores da interação com o FvW: Gln2100, Tyr2105, Ser2119, Arg2150 e Thr2154 no domínio C1 e Pro2300, Arg2304, e Arg2307 no domínio C2. Foram descritas mutações adicionais perto do domínio C1, nos resíduos Glu2087, Arg2090, Ile2098, Asn2129, e Pro2153 (Jacquemin *et al.*, 2000). Fora dos domínios C, um resíduo dentro do domínio A3, Tyr1680, tem sido associado com hemofilia leve, através da eliminação de um sítio para a sulfatação de tirosina que é fundamental para a afinidade com o FvW (Michnick *et al.*, 1994). Claramente, a perda da sulfatação é crucial, quer seja ou não acompanhada por mudanças estruturais ou no dobramento provocados pela introdução de um aminoácido diferente. Além desses sítios principais, várias outras mutações em sítios próximos parecem afetar a afinidade do FVIII pelo FvW.

O sítio principal de interação do FVIII com o FIXa é localizado entre os resíduos 484-508 e 558-565 no domínio A2 e entre os resíduos 1811-1818 no domínio A3. Como exemplo de mutações que afetam esses sítios, estão a mutação Ile566Thr, que cria um novo local de glicosilação, e a mutação Ser558Phe, que introduz uma cadeia lateral volumosa. Ambas as mutações criam um obstáculo estérico prejudicando a interação com o FIXa (Amano *et al.*, 1998).

Os domínios C1 e C2 do FVIII são importantes superfícies de interação com a membrana fosfolipídica. Devido à natureza crítica dessa interação para a função de cofator do

FVIII, não é surpreendente que mutações de sentido trocado que causem mesmo perturbações estruturais leves nestes domínios possam resultar em hemofilia A. Por exemplo, a mutação Val2223Met envolve uma superfície hidrofóbica exposta no domínio C2, que pode representar um sítio interativo a fosfolipídios. As mutações de sentido trocado também podem causar defeitos na ativação pela trombina, seja quando elas ocorrem diretamente nas regiões acídicas (Arg372, Arg740 e Arg1689), que fornecem os sítios de contato com a trombina, ou quando ocorrem em tirosinas sulfatadas (346, 664, 719, 721, 723 e 1680), que são importantes para facilitar a clivagem pela trombina.

Mutações de sentido trocado que levam à secreção reduzida também são um mecanismo comum que resulta em hemofilia A. Como é de se esperar, as que perturbam significativamente a estrutura terciária do FVIII vão gerar uma proteína que será retida e degradada, resultando em HA grave. No entanto, já foram descritas algumas mutações que causam perturbações menos graves no FVIII e uma reduzida mas significativa quantidade de proteína residual funcional secretada no plasma (Bogdanova *et al.*, 2007). Observou-se que 15 dos 16 resíduos de cisteína envolvidos em sete pontes dissulfeto da proteína são indispensáveis e mutações nesses resíduos resultaram em retenção intracelular total da proteína. Todas essas cisteínas estão no centro da proteína e formam pontes dissulfeto que são essenciais para a estabilidade da proteína (Selvaraj *et al.*, 2012).

Dinucleotídeos CpG também ocorrem com frequência no gene do FVIII, e uma alta frequência de mutações pontuais recorrentes pode ser observada nestas posições, normalmente transições devido à desaminação de metilcitosinas (Duncan & Miller, 1980). Cerca de 30% de todas as mutações pontuais em locais distintos do gene F8 surgem em dinucleotídeos CpG. O remanescente das mutações pode surgir, por exemplo, como resultado da incorporação errada de nucleotídeos durante a replicação do DNA. Quatro dos seis códons que codificam o aminoácido arginina contêm dinucleotídeos CpG, explicando porque a arginina é o aminoácido mais mutado na proteína, dado que pode ser observado na **Tabela 2**.

Além da multiplicidade de mutações de sentido trocado em pacientes com HA leve ou moderada, outros mecanismos genéticos podem causar a doença, como erros em sítios de processamento de RNAm, rearranjos e mutações no promotor do F8 e pequenas deleções ou inserções. Os erros em sítios de processamento de RNAm podem abolir sítios doadores ou aceptores de processamento ou ativar um sítio críptico. Esse tipo de mutação está associado com a gravidade variável da hemofilia, dependendo se há algumas transcrições corretas (presença de RNAm incorreto e correto) ou se existe uma perda completa do processamento do RNAm correto (doença grave). No promotor do F8 já foram identificadas mutações que

reduzem a expressão do FVIII, como a substituição -219C>T (Dai *et al.*, 2007) e -257 T>G (Riccardi *et al.*, 2009), localizadas em um sítio de ligação a fatores de transcrição.

Quanto às pequenas deleções ou inserções, os pontos de interrupção no F8 foram localizados nos elementos repetitivos, especialmente SINEs e LINEs, mas também em sequências únicas. Além disso, regiões de microhomologia também contribuem para o mecanismo de formação das duplicações. Uma duplicação recorrente em pacientes com a hemofilia A leve é a duplicação do éxon 13, que foi identificada pela primeira vez em um paciente italiano (Murru *et al.*, 1990). Esta duplicação é resultado de uma quebra não homóloga e eventos de recombinação de dois cromossomos desalinhados. A análise da sequência da região no ponto de interrupção revelou a presença de sequências ricas em AT e possíveis sítios para a topoisomerase I, causando a produção de duas formas de RNAm, um normal e um anormal. Outro tipo de mutação recorrente consiste em deleções ou inserções de uma adenina nas sequências repetidas de adenina em diversas posições do gene do FVIII. O maior trecho de nucleotídeos consiste em 9 adeninas (nos códons 1.191-1.194): a deleção de uma adenina foi relatada 34 vezes nesta posição (dados do HAMSTeRS), enquanto que a inserção da mesma foi relatada 12 vezes. A inserção recorrente ou exclusão de uma única adenina também tem sido relatada em segmentos mais curtos. Estas inserções ou deleções curtas são provavelmente causadas por erros de deslizamento da DNA polimerase durante a replicação. A **Tabela 2** mostra os principais sítios da proteína do FVIII que sofrem mutações recorrentes. Como pode-se observar, toda a extensão do gene pode sofrer mutações recorrentes, sendo as metilcitosinas os nucleotídeos mais propensos. Dependendo da atividade desempenhada pelo local em que ocorre a mutação, a função da proteína mutante vai ser afetada de uma forma diferente para cada indivíduo que possua uma mutação peculiar. Nota-se também que as mutações que criam códons de parada ocorrem com frequência em pacientes graves, mas não em leves e moderados.

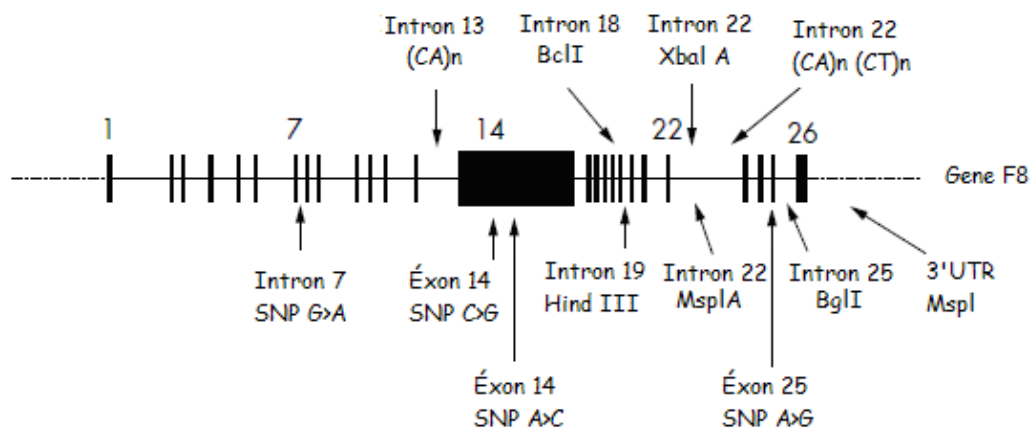
**Tabela 2.** Mutações recorrentes no F8.

Éxon	Mudança de nucleotídeo	Aminoácido		Função proposta	Gravidade (L,M,G)*	Nº de Relatos (HAMSTeRS 2012)
		(domínio afetado)	Mudança de aminoácido			
4	GTG>ATG	162 (A1)	Val>Met	Desconhecida	L, M	52
8	CGA>TGA	336 (A1)	Arg>Stop	Clivagem pela APC	G	25
10	GGA>AGA	479 (A2)	Gly>Arg	Ligação ao FIXa	L, M	32
11	CGG>TGG	527 (A2)	Arg>Trp	Desconhecida	L	41
11	CGC>TGC	531 (A2)	Arg>Cys	Pontes dissulfeto	L, M	44
11	CGC>CAC	531 (A2)	Arg>His	Desconhecida	L	33
12	CGC>TGC	593 (A2)	Arg>Cys	Pontes dissulfeto	L, M	129
14	TAT>TTT	1680 (B)	Tyr>Phe	Ligação ao FvW	M	28
14	CGC>TGC	1689 (a3)	Arg>Cys	Ativação pela trombina	M	29
16	CGT>CAT	1781 (A3)	Arg>His	Desconhecida	M	28
18	CGA>TGA	1941 (A3)	Arg>Stop	Desconhecida	G	19
18	CGA>CAA	1941 (A3)	Arg>Gln	Desconhecida	L, M	17
18	CGA>TGA	1966 (A3)	Arg>Stop	Desconhecida	G	27
18	CGA>CAA	1966 (A3)	Arg>Gln	Desconhecida	L	62
19	CGG>TGG	1997 (A3)	Arg>Trp	Desconhecida	M, G	48
19	GTG>GCG	2016 (A3)	Val>Ala	Desconhecida	G	75
22	CGA>TGA	2116 (A3)	Arg>Stop	Desconhecida	G	24
23	CGA>TGA	2147 (C1)	Arg>Stop	Desconhecida	G	31
23	CGT>CAT	2150 (C1)	Arg>His	Ligação ao FvW	L, M	99
23	CGC>TGC	2159 (C1)	Arg>Cys	Ligação ao Fvw; pontes dissulfeto	L	59
23	CGC>CAC	2163 (C1)	Arg>His	Desconhecida	M	26
24	CGA>CAA	2209 (C2)	Arg>Gln	Ligação ao FvW e fosfolipídeos	M, G	29
24	CGA>TGA	2209 (C2)	Arg>Stop	Ligação ao FvW e fosfolipídeos	G	40
25	TGG>TGT	2229 (C2)	Trp>Cys	Ligação ao Fvw; pontes dissulfeto	L, M	38
26	CGA>TGA	2307 (C2)	Arg>Stop	Ligação ao FvW	G	20
26	CGA>CAA	2307 (C2)	Arg>Gln	Ligação ao FvW	L	22

**Fonte:** Adaptado de Graw *et al.* (2005).

\* L = Leve; M = Moderada; G = Grave.

Além de um grande número de mutações, o FVIII contém diversos polimorfismos de nucleotídeo único e dois microssatélites relatados no interior do gene, um no íntron 13 (Lalloz *et al.*, 1991) e outro no íntron 22 (Lalloz *et al.*, 1992) (**Figura 9**). O microssatélite no íntron 13 compreende a repetição simples (CA)<sub>n</sub>, ao passo que o do íntron 22 compreende a repetição (CA)<sub>n</sub>(CT)<sub>n</sub>. O banco de dados HAMSTeRS descreve 13 polimorfismos em íntrons e 19 em éxons, sendo que o que possui maior número de descrições é um polimorfismo no éxon 14, que troca uma asparagina por um ácido glutâmico na posição 3780. Essas alterações, em princípio, não causam dano à proteína, mas é possível que elas influenciem nos níveis de FVIII de forma menos evidente. O fenótipo clínico exibido pelos hemofílicos A com a mesma mutação pontual não é sempre o mesmo. Entre as possíveis explicações para esse fato estão a influência de outras mutações e polimorfismos herdados em conjunto, diferenças laboratoriais nas dosagens de FVIII:C, ou os efeitos epistáticos de outros *loci*, como a co-herança de trombofilia, alterações no sistema fibrinolítico e anticorpos antifosfolipídios (Shetty *et al.*, 2007; Franchini *et al.*, 2009).



**Figura 9. Principais sítios polimórficos do F8.** Os sítios indicados foram descritos como não causadores de doença, apesar de seu papel na hemofilia A ser questionado. **Adaptado de Bowen (2002).**

A taxa de descoberta exponencial de novas alterações genômicas causadoras da hemofilia, assim como a necessidade de estudos comparativos das frequências das mutações em diferentes populações, determina que dados dessas diferentes populações sejam estudados e arquivados em banco de dados (Margaglione *et al.*, 2008). Recentemente, diversos estudos têm contribuído para o entendimento das mutações que originam a hemofilia A. A **Tabela 3** mostra uma breve compilação dos resultados obtidos nos principais trabalhos com pacientes de todas as gravidades; muitas das mutações listadas foram encontradas pela primeira vez na

população investigada. Como se pode observar, as mutações mais numerosas encontradas são as mutações de ponto. As inversões e grandes deleções ocorrem em pacientes graves. As diferentes populações estudadas são heterogêneas quanto às mutações encontradas, e isso deve estar relacionado com a diversidade na frequência de hemofílicos graves ou tipo de averiguação utilizado. Alguns dos estudos foram realizados com famílias, onde nem todos os indivíduos possuem alguma mutação; e além disso a taxa de detecção de mutações nos estudos com pacientes não relacionados nem sempre é completa. Variações em locais distantes em íntrons podem explicar a não detecção de mutações em todos os pacientes estudados, e essas variações podem criar novos sítios doadores ou aceptores de processamento ou ativar sítios crípticos que acabam introduzindo ou removendo éxons da proteína.



**Tabela 3.** Alguns estudos e as diferentes mutações encontradas em hemofílicos A graves, moderados e leves em populações no mundo.

População	N° indiv.	Inv22	Inv1	Mutações de ponto e pequenos rearranjos*	Grandes deleções	Nenhuma mutação detectada	Referências
<b>Ásia</b>							
Arábia Saudita	20	11	0	9	0	0	Abu-Amero <i>et al.</i> (2008)
China	148	57	3	67	0	127	Xue <i>et al.</i> (2010)
Coréia do Sul/1	38	15	1	14	3	5	Hwang <i>et al.</i> (2009)
Coréia do Sul/2	22	7	0	14	1	0	You <i>et al.</i> (2010)
China	18	**		18	0	0	Hua <i>et al.</i> (2010)
Índia/1	75	22	2	43	1	7	Ahmed <i>et al.</i> (2005)
Índia/2	109	51	2	44	4	101	Jayandharan <i>et al.</i> (2005)
Índia/3	36	**		29	0	7	Nair <i>et al.</i> (2010)
Irã	588	201	5	364	10	8	Ravanbod <i>et al.</i> (2012)
Jordânia	175	66	1	108	0	0	Awidi <i>et al.</i> (2010)
Líbano	79	23	2	53	1	0	Djambas Khayat <i>et al.</i> (2008)
Taiwan/1	31	12	1	15	1	2	Ma <i>et al.</i> (2008)
Taiwan/2	115	32	6	66	6	5	Chen <i>et al.</i> (2010)
<b>Europa</b>							
Albânia	37	2	0	19	4	12	Castaman <i>et al.</i> (2007)
Alemanha/1	147	55		47	8	37	Becker <i>et al.</i> (1996)
Alemanha/2	135	**		121	0	19	Bogdanova <i>et al.</i> (2007)
Bélgica	148	37	1	93	8	9	Lannoy <i>et al.</i> (2012)
Espanha/1	109	20	3	76	0	10	Fernandez-Lopez <i>et al.</i> (2005)
Espanha/2	267	130		137	0	0	Venceslá <i>et al.</i> (2008)

**Tabela 3. Continuação.**

<b>População</b>	<b>N° indiv.</b>	<b>Inv22</b>	<b>Inv1</b>	<b>Mutações de ponto e pequenos rearranjos*</b>	<b>Grandes deleções</b>	<b>Nenhuma mutação detectada</b>	<b>Referências</b>
Espanha/3	116	52	3	55	6	0	Casàna <i>et al.</i> (2008)
França/1	128	**		100	22	6	Vinciguerra <i>et al.</i> (2006)
França/2	406	111	3	95	0	197	Guillet <i>et al.</i> (2006)
França/3	94	21	0	72	1	0	Repešé <i>et al.</i> (2007)
Holanda	137	14	3	117	3	0	Boeckhorst <i>et al.</i> (2005)
Inglaterra/1	51	8	3	40	0	0	Hill <i>et al.</i> (2005)
Inglaterra/2	842	131	13	624	12	62	Green <i>et al.</i> (2008)
Itália/1	82	34	1	36	8	3	Salviato <i>et al.</i> (2007)
Itália/2	40	5	0	9	0	26	Santacroce <i>et al.</i> (2008)
Itália/3	128	64	3	52	1	9	Sanna <i>et al.</i> (2008)
Itália/4	1296	451	19	674	9	1153	Margaglione <i>et al.</i> (2008)
Itália/5	201	38	1	94	4	64	Riccardi <i>et al.</i> (2010)
Lituânia	63	24	0	33	4	2	Ivaskevicius <i>et al.</i> (2001)
Portugal/1	177	73	2	93	0	9	David <i>et al.</i> (2006)
Portugal/2	141	26	2	96	2	126	Silva Pinto <i>et al.</i> (2012)
Turquia	59	**		36	1	22	Timur <i>et al.</i> (2001)
<b>América</b>							
Argentina	173	25	1	29	10	108	Rosseti <i>et al.</i> (2007)
Brasil/1	49	3	0	31	4	11	Figueiredo <i>et al.</i> (1994)
Brasil/2	42	12	1	21	1	7	Arruda <i>et al.</i> (1995)
EUA	89	20	0	55	5	9	Citron <i>et al.</i> (2002)

**Tabela 3.** *Continuação.*

<b>População</b>	<b>N° indiv.</b>	<b>Inv22</b>	<b>Inv1</b>	<b>Mutações de ponto e pequenos rearranjos*</b>	<b>Grandes deleções</b>	<b>Nenhuma mutação detectada</b>	<b>Referências</b>
Venezuela	54	22	0	24	3	5	Albáñez <i>et al.</i> (2011)
<b>Oceania</b>							
Nova Zelândia	45	14	3	24	2	2	Laurie <i>et al.</i> (2007)

\* Inclui mutações de sentido trocado, sem sentido, mutações nos sítios de processamento, pequenas deleções e inserções.

\*\*O estudo foi realizado apenas com indivíduos sem inversão do intron 1 ou 22.

### **1.5. O Tipo de Mutação e o Desenvolvimento de Inibidores Anti-FVIII**

Embora os inibidores sejam mais frequentes em pacientes com HA grave (Wight & Paisley, 2003), e a incidência global de inibidores em hemofilia A leve e moderada esteja entre 3-13% (Rizza & Spooner, 1983; McMillan *et al.*, 1988; Sultan, 1992; Sharathkumar *et al.*, 2003), o desenvolvimento de anticorpos contra o FVIII em hemofílicos A leves pode causar consideráveis problemas clínicos, já que o inibidor, dirigido tanto contra o FVIII endógeno ou exógeno, geralmente muda o fenótipo das hemorragias de leves para graves (Hay, 1998). As características epidemiológicas, clínicas, patogênicas e terapêuticas dos inibidores em doentes leves e moderados são distintas das dos pacientes com HA grave (Wight & Paisley, 2003). Na maioria dos casos, os inibidores na hemofilia leve são caracterizados por altos títulos (White *et al.*, 2000) e ocorrem mais tarde durante na vida (na segunda ou terceira década) provavelmente porque raramente necessitam de tratamento com concentrados de FVIII durante sua juventude. A suspeita da presença de inibidor em pacientes leves ocorre quando eles adquirem um padrão de sangramento semelhante ao de hemofílicos graves, e essa mudança do padrão de hemorragia é explicada pela reação cruzada do inibidor com o FVIII endógeno.

Algumas mutações específicas de sentido trocado, localizadas principalmente nos domínios C1 e C2 da cadeia leve e no domínio A2 da cadeia pesada da molécula do FVIII, estão associadas a uma elevada e inesperada incidência de inibidores. Este é o caso para as mutações Tyr2105Cys, Arg2150Hys, Arg593Cys e Trp2229Cys (HAMSTeRS). Essas mutações podem afetar a formação de pontes de dissulfeto, o que vai estabilizar conformações anormais. Essas conformações anormais são antigênicamente distintas do FVIII não mutado. Eckhardt *et al.* (2009) coletaram dados de 138 pacientes leves e moderados durante um período de 28 anos, para identificar se a utilização perioperatória intensiva de concentrados de FVIII, especialmente quando administrados por infusão contínua, era associada com o desenvolvimento de inibidores. Eles encontraram que apenas em portadores da mutação Arg593Cys há um maior risco de desenvolvimento de inibidores.

Considerando os pacientes com todas as gravidades, Schwaab *et al.* (1995) descreveram a relação entre o tipo de mutação no gene do FVIII e o risco de desenvolvimento de inibidores. Pacientes com grandes deleções, com mutações sem sentido e com a inversão no íntron 22 apresentam cerca de 7-10 vezes mais risco de desenvolver inibidores do que pacientes com pequenas deleções e inserções, mutações de sentido trocado e mutações em sítios de

processamento. Em pacientes graves, Oldenburg & Pavlova (2006) realizaram um estudo com o tipo de mutação e os títulos dos inibidores. A **Tabela 4** apresenta os resultados encontrados. Nesse estudo, observa-se a baixa proporção de altos títulos de inibidores (> 5 BU/mL) em pacientes com mutações de sentido trocado (21%), enquanto pacientes com grandes deleções apresentaram uma grande proporção desses títulos (69%). As mutações em sítios de processamento não podem ser consideradas, pelo baixo número de pacientes estudados.

**Tabela 4.** Distribuição dos altos títulos de inibidores, em relação ao tipo de mutação em 201 pacientes com inibidores.

Tipo de Mutação	Nº de pacientes com inibidores	Nº de pacientes com inibidores de alto título	Alto título de inibidores (%)
Inversão do Íntron 22	91	35	38
Inversão do Íntron 1	6	2	33
Mutação Sem Sentido	26	9	35
Pequena Deleção/Inserção	17	5	29
Sítio de Processamento	4	3	75
Grandes Deleções	16	11	69
Mutações de Sentido Trocado	33	7	21

**Fonte:** Adaptado de Oldenburg & Pavlova (2006).

Gouw *et al.* (2010) também estudaram a influência do tipo de mutação com o desenvolvimento de inibidores. A prevalência de desenvolvimento de inibidores com alto título foi de 67% em pacientes com grandes deleções, 30% em pacientes com mutações sem sentido, 27% em pacientes com inversões do íntron 1 ou 22, 7% em pacientes com pequenas deleções ou inserções, 6% em pacientes com mutações de troca de sentido e 8% em pacientes com mutações em sítios de processamento. Nas mutações mais associadas com o desenvolvimento de altos títulos de inibidor (grandes deleções, mutações sem sentido e inversões), o risco de desenvolvimento foi 2,5 (IC 95% 1,2-5,4) maior quando comparado aos dos portadores de outras alterações.

## 1.6. Relação Estrutura-Função: Bioinformática Estrutural

Ao compreender-se o efeito que uma mutação exerce em uma proteína, obtém-se subsídios para uma melhor avaliação de sua função, bem como das interações entre ela e estruturas afins. Uma série de trabalhos vêm sendo feitos, descrevendo novas mutações e seus possíveis efeitos no FVIII. A relação entre causa e efeito nem sempre é clara, e apenas para uma minoria das mutações já se conhece o efeito que ela causa no FVIII. Essas mutações envolvem aquelas cujo efeito é evidente, onde o gene é interrompido, a tradução é terminada prematuramente, a ativação da proteína é impedida, o processamento do RNAm é corrompido, ou a transcrição é diminuída (mutações no promotor). Para a maioria das mutações não há nenhuma explicação óbvia para o efeito, e, nesse caso, aceitam-se explicações candidatas, como a desestabilização da proteína, dobramento incorreto, perturbação de regiões importantes estruturalmente ou funcionalmente, e assim por diante. Estas possibilidades são muitas vezes difíceis de provar. No entanto, a cristalografia de raios x e avanços nos *softwares* para modelagem molecular e previsão da estrutura de proteínas permitiram que estas possibilidades fossem exploradas para algumas mutações (Pemberton *et al.*, 1997; Mertens *et al.*, 1999). A análise molecular dos efeitos das alterações baseada na estrutura cristalizada do FVIII tem sido muito usada para a compreensão da relação estrutura-função nessa molécula (Jayandharan *et al.*, 2005). Uma vez conhecida a estrutura da proteína, torna-se possível avaliar os possíveis efeitos de alterações em regiões específicas da mesma, bem como o desenho de experimentos para aprimorar o conhecimento de seu mecanismo de ação. Foram desenvolvidas ferramentas computacionais para a imagem gráfica de uma estrutura protéica, para a manipulação dessa estrutura “*in silico*”, e para o cálculo de diferentes energias de interação entre seus diferentes domínios. Assim, novas mutações de sentido trocado são avaliadas através (1) do estudo da acessibilidade de resíduos, onde resíduos enterrados (definidos como com acessibilidade inferior a 10%) são geralmente hidrofóbicos, suspeitos de contribuir para a estabilidade de proteínas globulares, enquanto os resíduos hidrofílicos são superficiais, sendo que a troca entre esses dois grupos afeta a estrutura terciária da proteína; (2) de alinhamentos múltiplos do FVIII (humano, suíno, canino e de rato), FV (humano e bovino) e ceruloplasmina (humana e de rato), onde resíduos conservados em mamíferos diferentes geralmente desempenham um papel mais importante na manutenção da estrutura e função normais do FVIII; (3) da criação de preditores do possível impacto de uma mutação de sentido trocado; (4) de preditores de sítios de processamento de RNAm. A análise de mutações de sentido trocado no gene do FVIII é importante para a determinação do papel de

resíduos específicos do FVIII no processamento pós-traducional, interações proteína-proteína e com metais, ativação funcional e estrutura-função em geral. A partir dessa análise, consegue-se prever se a mutação provoca efeitos na posição, efeitos distantes, ou afeta diretamente as ligações dentro da molécula.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

O presente estudo visa à detecção de mutações no DNA de pacientes com hemofilia A leve e moderada do Rio Grande do Sul e posterior análise do papel dessas mutações na determinação da doença e presença de inibidores. O tipo da mutação geralmente prediz o fenótipo clínico, e, assim, a caracterização de mutações pode ajudar a identificar aminoácidos ou regiões com propriedades funcionais ou estruturais essenciais e então esclarecer mecanismos da patogênese da hemofilia A. O estudo possibilitará um melhor entendimento da genética molecular da doença nessa população, e essa informação é valiosa para o aconselhamento genético dos pacientes e seus familiares.

### **2.2. Objetivos específicos**

a) Realizar um estudo em paralelo com uma investigação independente de análise de mutações em hemofílicos A graves, para a melhor compreensão da patogênese em pacientes com diferentes gravidades da doença. Os hemofílicos leves e moderados serão investigados para possíveis mutações de ponto no gene do FVIII, pequenas deleções e inserções e grandes duplicações.

b) Relacionar através da bioinformática as mutações encontradas com os fenótipos dos pacientes; as mutações podem afetar regiões críticas para a biossíntese apropriada do FVIII, modificar sítios de ativação pela trombina, diminuir a estabilidade intramolecular, ou abolir regiões de interações do FVIII com outras proteínas.

c) Realizar uma avaliação geral da influência de mutações no F8 na formação de inibidores anti-FVIII, incluindo pacientes graves estudados em uma investigação prévia.

**CAPÍTULO 2 - DETECTION OF NEW MUTATIONS AND MOLECULAR  
PATHOLOGY OF MILD AND MODERATE HAEMOPHILIA A PATIENTS FROM  
SOUTHERN BRAZIL**

---

Artigo submetido para publicação na revista *Haemophilia*.



**Detection of new mutations and molecular pathology of mild and moderate Haemophilia  
A patients from southern Brazil**

C. ROSSET, I. A. VIEIRA, M. SINIGAGLIA, R.P. GORZIZA, F.M. SALZANO and E.  
BANDINELLI

*Genetics Department, Biosciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto  
Alegre, RS, Brazil*

**Running title:** MUTATIONS IN MILD AND MODERATE HAEMOPHILIA A PATIENTS

**Keywords:** haemophilia A, factor VIII, mutation effects, structural analysis, amino acid changes, genotype-phenotype correlation.

---

**Correspondence:** Francisco M. Salzano, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil, Tel.: +50 51 33086747, Fax: +50 51 33089823, E-mail: francisco.salzano@ufrgs.br

**Summary.** A total of 76 unrelated male patients with mild (n = 55) or moderate (n = 21) haemophilia A living in the southern Brazilian state of Rio Grande do Sul were studied by direct sequencing of all F8 26 exons, the 5' UTR and 3' UTR, intron-exon junctions and the promoter region. When no mutation was found, a MLPA analysis was performed. We identified the disease causing mutations in 69 patients, who showed 33 different mutations: 27 missense, one small deletion, two small duplications and three splice site mutations. Seven missense and two splice site mutations were not previously reported in HAMSTeRS and were not identified in any current literature search. Nine recurrent mutations were found, one of them never described before (p.Tyr1786Phe). Haplotype analysis indicated that this mutation had originated in the Brazilian population as a single event in a common ancestor. The possible influence of these mutations in the determination of the disease was carefully considered, including bioinformatic tools. These data add to the general knowledge of the disease and can also be useful for HA diagnosis and detection of carriers in the southern Brazilian population.

## Introduction

Factor VIII (FVIII), a plasma glycoprotein, is a crucial cofactor required in blood coagulation. Partial or total deficiency or functional defect of this cofactor results in the hereditary disease haemophilia A (HA), a recessive X-linked disorder that results in bleeding diathesis [1], with a worldwide incidence of approximately one in 5 000 male newborns [2]. HA is generally caused by mutations in the FVIII gene (F8), which is located at Xq28, and is maintained in the population either through carrier transmission or by *de novo* mutations, with one-third of the cases being sporadic [3]. F8 spans 186 kilobases (kb) and consists of 26 exons [4] that code for an approximately 9 kb mRNA, a precursor protein of 2351 amino acids, and a mature peptide of 2332 amino acids [5]. The latter is arranged within six domains and acidic regions organized as A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2 [6]. Additionally, FVIII is modified by a variety of posttranslational processes, including N-linked glycosylation and sulfation [7,8]. FVIII circulates in plasma as a heterodimer with a heavy and a light chain linked by metal ions such as  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$ , and forms a non-covalent complex with von Willebrand factor (vWF), which protects FVIII from degradation [9]. Through activation by thrombin or factor X (FX), FVIII dissociates from vWF and interacts with factor IX (FIX), phospholipid membranes and FX to promote coagulation. The acidic C-terminus of the A1 subunit contains a FX interactive site [10]; the A2 domain has several FIX binding sites [11] and the A3 domain has other FIX binding sites [12]. von Willebrand factor [13] and phospholipids [14] interact with the C2 domain. In addition, F8 is regulated by a 1175bp promoter, and mutations in this site have been described by Figueiredo *et al.* [15].

At present, more than 1215 mutations within the F8 coding and untranslated regions have been identified and listed in the F8 mutation database [16]. The type of mutation correlates with FVIII residual clotting activity (normal 40-100%). According to this residual

activity, HA is classified into three clinical phenotypes: severe (FVIII:C <1%), moderate (FVIII:C 1-5%) and mild (FVIII:C 5-40%) [17]. In severe HA, approximately 30-50% of the patients have the intron 22 inversion mutation [18] and approximately 2-5% the intron 1 inversion [19]; with the exception of these two mutations, the molecular basis of hemophilia A is characterized by a large number of diverse point mutations. Moderate and mild phenotypes usually result from missense, promoter and splice site mutations, small deletions/duplications and exon 13 duplications, leading to an abnormal FVIII protein production or its reduced synthesis and/or release into the circulation. Single nucleotide polymorphisms and microsatellites have also been identified in the gene, useful for linkage analysis, to discriminate whether a mutation represents a mutation hotspot or a founder mutation, and to trace patients' ancestry [20].

The objectives of this study were (a) to identify gene mutations in patients with mild and moderate hemophilia A living in the southern Brazilian state of Rio Grande do Sul; and (b) to analyze the role of these mutations in disease determination. Despite the large number of reported F8 changes, identification of novel mutations continues to add significant information regarding genotype-phenotype correlations and can help identifying amino acids or regions that are essential for FVIII functionality. This information is also valuable for genetic counseling of patients and their families. The work is related to a long term project of study of our population for blood coagulation disorders (recent studies reported in [21-23]).

## **Patients and methods**

### *Patients*

A total of 76 unrelated male patients with mild (n = 55) or moderate (n = 21) haemophilia A, classified according to criteria of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH), were included in the study. At the time of the study, the average age of patients was 27.5 years, ranging from 1 to 71 years. As for ethnicity, the sample has 68 (89%) Eurodescendants, 7 (10%) Afrodescendants, and one (1%) Native America descendant. The study was approved by our institutional review board and all patients or legal representatives signed a written informed consent.

### *Coagulation assays and DNA extraction*

FVIII coagulation activity (FVIII:C) was measured using the one-stage clotting assay [24]. Genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes using nonenzymatic methods [25].

### *DNA sequencing*

All F8 26 exons, the 5' UTR and 3' UTR and intron-exon junctions were amplified by PCR using 35 primer pairs [26]; the promoter region was amplified using 2 primer pairs [27]. PCR products were purified using the Exo-Sap kit (Amersham Biosciences, Les Ulis, France). Sequencing was conducted by Macrogen Inc. (Seoul, Korea). All the nucleotide changes identified were confirmed by repeating the PCR and sequencing reactions. When no mutation was found, von Willebrand's disease type 2N was ruled-out by sequencing vWF gene exons 18–21. To verify the disease causing nature of the novel mutations, we examined 100 normal chromosomes from blood bank donors of the same ethnic groups to exclude a polymorphic change.

### *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification analysis*

DNA from patients lacking identified mutations using direct sequencing were screened employing the SALSA Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) Kit P178 Factor VIII (MRC, Amsterdam, The Netherlands), to detect large genomic rearrangements, tested according to manufacturer's instructions. Amplification products were identified on an ABI3130xl capillary sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and evaluated using Coffalyser.net. Peak ratios of <0.70 were considered to be deletions and ratios >1.40 to be duplications. DNA samples from healthy individuals were used as negative controls.

### *Haplotype analysis*

Haplotype profiles of patients with the same mutation were determined for four dinucleotide (DXS1073, DXS1108, F8 intron 13, F8 intron 22) and one tetranucleotide (DXS9897) repeat tracts with low recombination frequencies located within, or adjacent to the F8 locus, as previously described [28]. Products were analysed using the PeakScanner software (v1.0) (Applied Biosystems). Genotypes for single nucleotide polymorphisms in intron 3 (c.388 - 9C>T), intron 7 (c.1010-27G>A), exon 14 (c.3780C>G; c.3864A>C), intron 18 (c.5998+91T>A), exon 25 (c.6769 A>G) and 3'UTR (c.8728 A>G) were determined by DNA sequencing. Additionally, the HindIII polymorphic site in intron 19 was studied by a restriction fragment length polymorphism method [29]. Allele frequencies for each of these markers were determined by analyzing 100 normal chromosomes.

### *Nomenclature*

DNA mutation numbering was based on cDNA sequence NM\_000132.2, with nucleotide +1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon of the reference sequence. Protein changes are reported according to international recommendations for the description of sequence variants of the Human Genome Variation Society (HGVS;

<http://www.HGVS.org>). Variants are also shown in the tables according to the HAMSTeRS numbering [16].

### *Bioinformatic analysis*

F8 patients' sequences were compared with the FVIII reference sequence (gene accession - NCBI: NG\_005114.1) using the CodonCode Aligner software implemented in MEGA 5.04. All mutations were compared to those described in HAMSTeRS [16]. Conservation of mutated aminoacids was examined at respective positions in human, porcine, murine, and canine F8, using the publicly available multiple sequence alignment lineup, at the F8 mutation database [16].

We assumed that a given missense mutation is causally related to HA according to the following criteria: (1) the mutation cosegregated in other individuals from the same family (when available); (2) it was not detected in a panel of 100 X-chromosomes from healthy individuals; (3) no other nucleotide change was found in the F8 coding region or in exon-intron boundaries; (4) the mutation was conserved or conservatively replaced in FVIII from different species; (5) analyses using the Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP) Splice Site Prediction program; and (6) three algorithms to predict the impact of missense mutations on protein structure and function: PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping) [30], Site Direct Mutator (SDM) [31] and Have yOur Protein Explained (HOPE) [32]. PolyPhen performs the prediction through sequence-based characterization of the substitution site, calculation of position-specific independent count (PSIC) profile scores for two amino acid variants, and calculation of structural parameters and contacts. PolyPhen-2 gives a prediction confidence score ranging between 1 (probably damaging) to 0 (benign). SDM calculates a stability score which is analogous to the free energy difference between a wild-type and a mutant protein, which is useful for evaluating whether a mutation will impact protein structure. HOPE collects

structural information from a series of sources, including calculations on the 3D protein structure, sequence annotations in Uniprot and predictions from Distributed Annotation System servers. HOPE combines this information to analyze the effect of a certain mutation on the protein structure and function. Finally, the crystal structure of FVIII (2R7E) available at the Protein Data Bank (PDB - <http://www.rcsb.org/pdb/home/>) was used to localize the mutations found in the patients; the image was generated with the PyMol software. For A domains, macromolecular structure, and electrostatic surface visualization, the GRASP2 program was used.

## **Results and discussion**

We identified the disease causing mutations in 69 (91%) of the 76 screened patients, which showed 33 different mutations: 27 (82%) missense, one (3%) small deletion, two (6%) small duplications and three (9%) splice site mutations, as expected in mild/moderate haemophiliacs. The mutations are distributed throughout the whole sequence of the F8 gene, but predominantly in A domains and exon 14. Seven missense and two splice site mutations were not previously reported in HAMSTeRS and were not identified in any current literature search. Twenty four mutations had a single occurrence.

The previously described mutations are summarized in Table 1. They comprise 20 missense mutations, one splice site and three frameshift mutations, distributed along all FVIII domains. Eight of them occurred in more than one patient. In all cases, their relationship with FVIII deficiency has already been demonstrated and they were considered as causative mutations for HA. The disease severity of patients is also shown in the table, and is in agreement with HAMSTeRS.



Table 2 shows the predicted effect of the missense mutations previously described in HAMSTeRS. All of them, except one, were scored as probably damaging by PolyPhen. SDM evaluates the protein structure and does not consider protein function, so the 15 mutations predicted by it as non-disease-associated in our series can still have a pathological role. If we turn to the effects detected by HOPE, we verify that all 20 mutations could have a deleterious effect, by molecular changes which would lead to structural modifications (spacing between units, incorrect folding, binding changes) as well as to charge and hydrophobicity alterations. These changes would be especially important if they are near binding sites with other proteins (Factor X, thrombin, vWF, FIX). Arg593Cys was reported as resulting in an increased incidence of inhibitors [33], the most serious complication in HA treatment, but this effect was not observed by us in its seven carriers.

#### *Previously unreported missense mutations*

Altogether seven novel missense mutations were detected in 10 patients; they are listed in Table 3. One of them (p.Tyr1786Phe) was present in four patients and the rest are unique mutations. All seven mutations are localized in A domains, as shown in Figure 1. They did not occur in the control sample of 100 chromosomes and were not described as F8 polymorphisms in the HAMSTeRS database. No other mutations were detected in individuals carrying these mutations. All were conserved among mammalian species (Table 4), with the exception of p.Val266Met, which is not conserved in murine animals. In this case we have already established that the mutation is deleterious, as it is near a  $\text{Cu}^{2+}$  binding site on the interface between A2 and A3 domains (Figure 1); mutation in this residue can disturb interactions between these domains. Amino acids His267 / Cys310 / His315 / Met320 are fundamental for  $\text{Cu}^{2+}$  binding and A1/A3-C1-C2 and A2 interaction [34]. Furthermore, the presence of previously reported mutations in the same residue could further highlight its importance and

PolyPhen predicted the mutation as probably damaging (Table 5). Table 4 also shows the clinical severity and family history of the affected patients. One case (p.Ser650Tyr) is found on a moderate sporadic patient, in a very conserved region. Table 5 shows the predicted effect of these new missense mutations. According to PolyPhen, six were considered as probably damaging and one as possibly damaging (score of 0.8).

The systematic individual discussion of these mutations follows. In the A1 domain, in exon 7, p.Val266Met and p.Gly304Val were found; the latter was found in a moderate patient and its PolyPhen score is 1.0. The wild-type residue is a glycine, the most flexible of all residues. This flexibility might be necessary for the protein's function. The mutant residue is bigger and the torsion angles for this residue are unusual. The residue is located on the surface of the protein near a FX binding site [10]; mutation in this residue can disturb these interactions (Figure 1 and Tables 5 and 6). In the A2 domain, p. Met567Lys was found in a moderate patient in exon 12. This mutation introduces a charge change at this position (Figure 2 and Table 5) and can cause repulsion between the mutant and neighboring residues. The wild-type and mutant amino acids differ in size and hydrophobicity and are on the protein surface, near a FIX binding site [11]; mutation in this residue can disturb these interactions. Mutation p. Ser650Tyr was found in a moderate patient in exon 13; the wild-type residue forms a hydrogen bond with leucine 689. The size difference between wild-type and mutant residues leads to an incorrect position to make the same hydrogen bond, and protein interactions can be affected. All mutations in the A3 domain are near FIX and vWF binding sites [12; 13]; p.Arg1764Gly was found in exon 15. This mutation introduces a glycine at this position. Glycines are very flexible and can disturb the protein's required rigidity. There is also a difference in charge (Figure 3 and Table 5 and 6), size and hydrophobicity between the wild-type and mutant amino acid, which can cause an empty space in the core of the protein and disturb correct folding. In exon 16, p.Tyr1786Phe and p.Tyr1792Cys were found. In the first,

the wild-type and mutant amino acids differ in size and hydrophobicity. This causes an empty space in the core of the protein and loss of hydrogen bonds, disturbing protein interactions. Mutation p.Tyr1792Cys codifies a smaller amino acid with different hydrophobicity and might disturb the core structure of this domain. There is no doubt of the profound effect that the introduction of a cysteine would have on the tertiary structure of the FVIII protein, causing a major structural rearrangement.

#### *Splice site mutations*

Three splice mutations were found: the previously described c.6188 +1G>A in intron 20, in a moderate HA patient (Table 1) plus the novel c.6430-1\_6430-4delACAG and c.6430-8\_6430-16delTAATCTCTC in another moderate patient, that presented two mutations (Table 3). Splice site prediction on the BDGP server indicated that 6188 +1G>A deletes the donor splice site of intron 20, with a score of 0.9 (a score > 0.4 indicates the presence of a splice site). The study of RNA samples showed an exon skipping (exon 20) for this mutation [35]. c.6430-1\_6430-4delACAG and c.6430-8\_6430-16delTAATCTCTC are predicted to affect the acceptor splice site of intron 22, with a score of 0.92 and could explain the moderate phenotype of this patient.

#### *Deletions and duplications*

One previously described deletion (c.3637delA) was found in two moderate patients, as well as two already described duplications (c.3638dupA; c.4380dupA) in mild and moderate patients, respectively. They result in frameshifts with a premature introduction of a stop codon. Exon 14, where they occurred, was already identified as a hotspot for such mutations, mainly due to the presence of several long polyadenine runs [36]. Although this type of mutation could be predicted to lead to a severe disorder, a number of less severe clinical

phenotypes resulting from them have been reported [37]. It was proposed that restoration of the reading frame by polymerase errors or ribosomal frameshifting may occur in these cases and would explain the less severe phenotype.

#### *Patients without molecular detectable defects*

No obvious disease-causing F8 mutation was found in seven HA patients (9%). MLPA analysis was performed on their DNA, but no changes were found. A mutation could exist in a non-conserved intronic region distant from the exon-intron boundaries, which could have an effect on the splicing process or gene-regulation, causing a reduction of normal mRNA transcript. It is also possible that variations in other proteins could be responsible for the reduced FVIII:C in these cases.

#### *F8 gene polymorphisms and haplotyping*

The polymorphic changes found in this study and their frequencies in patients and controls are listed in Table 7. All, except one, were previously described and are not related to disease. A few previous reports have described recurrent F8 mutations due to founder effects, associated with a mild or moderate HA [38]. The high frequency of some mutations in our study led us to investigate whether these mutations occurred *de novo* through independent mutational events or if they shared a common ancestor with their frequency representing a founder effect (See Patients and methods). The results are shown in Table 8, and indicated that founder effects could have occurred, and were especially marked in p.Ile1679Thr, p.Arg1749Cys and p.Tyr1786Phe. All of these patients had different surnames, and no connections between them could be found in the genealogical information obtained. However, for the p.Ile1679Thr carriers, eight of the 12 were born in Tapes, in Rio Grande do Sul's southwest. No special connections could be found in relation to the other patients, but at least 10 generations should

have occurred since the state's colonization, blurring eventual relationships. Therefore, the simplest explanation for these findings is a founder effect.

## **Conclusion**

The novel mutations identified in this study contribute significantly to the understanding of HA molecular pathology and have great importance for genetic counseling. Several missense mutations associated with mild to moderate hemophilia A seems to have been introduced into the southern Brazilian population by an ancestral founder effect.

## **Acknowledgements**

We would like to thank Ana M. C. B. Pereira and Ana P. Ornaghi for laboratory help, Gustavo F. Vieira and Dinler Amaral Antunes for bioinformatics advice, as well as the patients and staff of HEMOCENTRO-RS for agreeing to participate in the study and for logistical support. Financing was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Apoio a Núcleos de Excelência Program).

## **Conflicts of interest**

There are no conflicts of interest.

## References

- 1 Tuddenham EG. Factor VIII and haemophilia A. In: Tuddenham EDG ed. *The Molecular Biology of Coagulation*. London: Baillière & Tindall, 1989: 849-877.
- 2 Kazazian HH Jr, Tuddenham EGD, Antonarakis SE. Hemophilia A parahemophilia: deficiencies of coagulation factors VIII and V. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. New York: McGraw Hill 1995: 3241-3267.
- 3 Antonarakis SE, Kazazian HH, Tuddenham EGD. Molecular etiology of factor VIII deficiency in haemophilia A. *Hum Mut* 1995; **5**: 1-22.
- 4 Gitscheir J, Wood WI, Goralka TM. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 1984; **312**: 326-330.
- 5 Vehar GA, Key B, Eaton D, Rodriguez H, O'Brien DP, Rotblat F *et al.* Structure of human factor VIII. *Nature* 1984; **312**: 337-342.
- 6 Kane WH, Davie EW. Blood coagulation factors V and VIII: structural and functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders. *Blood* 1988; **71**: 539-555.
- 7 Dorner AJ, Bole DG, Kaufman RJ. The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins. *J Cell Biol* 1987; **105**: 2665-2674.
- 8 Leyte A, van Schijndel HB, Niehrs C, Huttner WB, Verbeet MP, Mertens K, van Mourik JA. Sulfation of Tyr1680 of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII with von Willebrand factor. *J Biol Chem* 1991; **266**: 740-6.

- 9 Fang H, Wang L, Wang H. The protein structure and effect of factor VIII. *Thrombosis Res* 2007; **119**: 1-13.
- 10 Lappan KA, Fay PJ. Interaction of the A1 subunit of factor VIII and the serine protease domain of factor X identified by zero-length cross-linking. *Thromb Haemost* 1998; **80**: 418-422.
- 11 Fay PJ, Beattie T, Huggins CF, Regan LM. Factor VIIIa A2 subunit residues 558-565 represent a factor IXa interactive site. *J Biol Chem* 1994; **269**: 20522-27.
- 12 Lenting PJ, van de Loo JWHP, Donath MJSH, Mertens K. The sequence Glu(1811)-Lys(1818) of human blood coagulation factor VIII comprises a binding site for activated factor IX. *J Biol Chem* 1996; **271**:1935-1940.
- 13 Saenko EL, Scandella D. The acidic region of the factor VIII light chain and the C2 domain together form the high affinity binding site for von Willebrand factor. *J Biol Chem* 1997; **272**:18007-18014.
- 14 Foster PA, Fulcher CA, Houghten RA, Zimmerman TS. Synthetic factor VIII peptides with amino acid sequences contained within the C2 domain of factor VIII inhibit factor VIII binding to phosphatidylserine. *Blood* 1990; **75**: 1999-2004.
- 15 Figueiredo MS, Brownlee GG. Cis-acting elements and transcription factors involved in the promoter activity of the human Factor VIII gene. *J Biol Chem* 1995; **270**: 1-11.
- 16 The Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site (HAMSTeRS). Available at: <http://europium.csc.mrc.ac.uk/Web-Pages/Main/main.htm> (last accessed on 10 January 2013).

- 17 White GC II, Rosendaal F, Aledort LM, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C *et al.* Factor VIII and Factor IX Subcommittee. Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 2001; **85**:560.
- 18 Lakich D, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet* 1993; **5**: 236-241.
- 19 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**: 168-174.
- 20 Machado FB, Medina-Acosta E. High-resolution combined linkage physical map of short tandem repeat loci on human chromosome band Xq28 for indirect haemophilia A carrier detection. *Haemophilia* 2009; **15**: 297-308.
- 21 Leiria LB, Roisenberg I, Salzano FM, Bandinelli E. Introns 1 and 22 inversions and factor VIII inhibitors in patients with severe haemophilia A in southern Brazil. *Haemophilia* 2009; **15**: 309-313.
- 22 Agostini D, Rosset C, Botton MR, Kappel DB, Vieira IA, Gorziza RP *et al.* Immune system polymorphisms and factor VIII inhibitor formation in Brazilian haemophilia A severe patients. *Haemophilia* 2012; **18**: 416-8.
- 23 Gorziza RP, Vieira IA, Kappel DB, Rosset C, Sinigaglia M, Leiria LB *et al.* Genetic changes in severe haemophilia A: new contribution to the aetiology of a complex disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2013; **24**:164-9.
- 24 Austen DEG, Rhymes IL. A Laboratory Manual of Blood Coagulation. *Blackwell Scientific, Oxford*, pp. 109.



- 25 Lahiri DK, Nurnberger J. A rapid nonenzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucl Acids Res* 1991; **19**: 5444.
- 26 Hwang SH, Kim MJ, Lim JA, Kim HC, Kim HS. Profiling of Factor VIII mutations in Korean haemophilia A. *Haemophilia* 2009; **15**: 1311-17.
- 27 Boekhorst J, Verbruggen B, Lavergne JM, Costa J-M, Schoormans SCM, Brons PPT *et al.* Thirteen novel mutations in the factor VIII gene in the Nijmegen haemophilia A patient population. *Brit Haematol* 2005; **131**: 109-117.
- 28 Harraway JR, Smith MP, George PM. A highly informative, multiplexed assay for the indirect detection of hemophilia A using five-linked microsatellites. *J Thromb Haemost* 2006; **4**: 587-590.
- 29 Surin VL, Zhukova EL, Krutov AA, Solovyev GY, Grineva NI. Simple and convenient detection of a HindIII polymorphic site in intron 19 of factor VIII using PCR. *Nucl Acids Res* 1990; **18**: 3432.
- 30 Adzhubei IA, Schimidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010; **7**: 248-9.
- 31 Worth CL, Preissner R, Blundell TL. SDM – a server for predicting effects of mutations on protein stability and malfunction. *Nucl Ac Res* 2011; **39**: 215-232.
- 32 Venselaar H, Te Beek TA, Kuipers RK, Hekkelman ML, Vriend G. Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC Bioinformatics* 2010; **11**:548.
- 33 James EA, Van Haren SD, Ettinger RA, Finjvandraat K, Liberman JA, Kwok WW *et al.* T-cell responses in two unrelated hemophilia A inhibitor subjects include an epitope at the factor VIII R593C missense site. *Thrombosis Haemost* 2010; **9**: 689-699.

- 34 Nakamura M, Shishido N, Nunomura A, Smith MA, Perry G, Hayashi Y, *et al.* Three histidine residues of amyloid-beta peptide control the redox activity of copper and iron. *Biochemistry* 2007; **46**:12737-43.
- 35 Lannoy N, Abinet I, Bosmans A, Lambert C, Vermylen C, Hermans C. Computational and molecular approaches for predicting unreported causal missense mutations in Belgian patients with haemophilia A. *Haemophilia* 2012; **18**: 331-9.
- 36 Nakaya S, Liu ML, Thompson AR. Some factor VIII exon 14 frameshift mutations cause moderately severe haemophilia A. *Br J Haematol* 2001; **115**: 977–982.
- 37 Oldenburg J, Schroder J, Schmitt C, Brackmann HH, Schwaab R. Small deletion/insertion mutations within poly-A runs of the factor VIII gene mitigate the severe haemophilia phenotype. *Thromb Haemost* 1998; **79**: 452–3.
- 38 Laurie AD, Sheen CR, Hanrahan V, Smith MP, George PM. The molecular aetiology of haemophilia A in a New Zealand patient group. *Haemophilia* 2007; **13**: 420–7.

**Table 1.** Previously described (HAMSTeRS) mutations detected in this study.

N° of patients <sup>1</sup>	Clinical		Nucleotide change <sup>2</sup>	Amino acid change <sup>3</sup>	Amino acid change <sup>4</sup>	Mutation type	Exon/intron	FVIII domain
	severity							
1	Mild		c.289 G>C	p.Ala97Pro	p.Ala78Pro	Missense	3	A1
1	Mild		c.460 A>G	p.Thr154Ala	p.Thr135Ala	Missense	4	A1
1	Mild		c.871 G>A	p. Glu291Lys	p. Glu272Lys	Missense	7	A1
2	Moderate		c.902 G>T	p.Arg301Leu	p.Arg282Leu	Missense	7	A1
1	Moderate		c.1171 C>T	p.Arg391Cys	p.Arg372Cys	Missense	8	a1
1	Mild		c.1172 G>A	p.Arg391His	p.Arg372His	Missense	8	a1
1	Mild		c.1492 G>A	p.Gly498Arg	p.Gly479Arg	Missense	10	A2
4	Mild		c.1636 C>T	p. Arg546Trp	p. Arg527Trp	Missense	11	A2
7	Mild		c.1834 C>T	p. Arg612Cys	p. Arg593Cys	Missense	12	A2
1	Mild		c.2167 G>A	p.Ala723Thr	p.Ala704Thr	Missense	14	B
1	Mild		c.2215 G>A	p.Glu739Lys	p.Glu720Lys	Missense	14	B
2	Moderate		c.3637delA	p.Ile1213Phe	p.Ile1194Phe	Frameshift in 9A run	14	B
1	Mild		c.3638dupA	p.Ile1213Asn	p.Ile1194Asn	Frameshift in 9A run	14	B

**Table 1.** (Cont.)

N° of patients <sup>1</sup>	Clinical						
	severity	Nucleotide change <sup>2</sup>	Amino acid change <sup>3</sup>	Amino acid change <sup>4</sup>	Mutation type	Exon/intron	FVIII domain
1	Moderate	c.4380dupA	p.Asn1460Lys	p.Asn1441Lys	Frameshift in 8A run	14	B
16	Mild	c.5093 T>C	p.Ile1698Thr	p.Ile1679Thr	Missense	14	a3
2	Moderate/Mild	c.5122 C>T	p.Arg1708Cys	p.Arg1689Cys	Missense	14	a3
7	Mild	c.5302 C>T	p.Arg1768Cys	p.Arg1749Cys	Missense	15	A3
1	Moderate	c.5399 G>A	p.Arg1800His	p.Arg1781His	Missense	16	A3
1	Mild	c.5879 G>A	p.Arg1960Gln	p.Arg1941Gln	Missense	18	A3
1	Moderate	c.6037 G>A	p.Gly2013Arg	p.Gly1994Arg	Missense	19	A3
1	Moderate	c.6188 +1G>A	-	-	Splicing	IVS20	-
1	Mild	c.6506 G>T	p.Arg2169Leu	p.Arg2150Leu	Missense	23	C1
1	Moderate	c.6563 G>A	p.Cys2188Tyr	p.Cys2169Tyr	Missense	23	C1
2	Mild	c.6932 C>A	p.Pro2311His	p.Pro2292His	Missense	26	C2

<sup>1</sup> Number of independent patients carrying the same mutation.

<sup>2</sup> DNA mutation numbering is based on cDNA sequence, with nucleotide +1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon.

<sup>3</sup> Sequence changes at protein level following the Nomenclature for Description of Genetic Variations approved by the Human Genome Variation Society.

<sup>4</sup> Sequence changes at protein level according to HAMSTeRS database. The first alanine of the mature protein is numbered as 1.

**Table 2.** Predicted effect of missense mutations on the FVIII protein detected in this study and previously described in HAMSTeRS.

Mutation <sup>1</sup>	Polyphen (score)	Site Direct Mutator prediction (SDM)	Putative deleterious effect
			(HOPE and present bioinformatic analysis)
p.Ala78Pro	0.966	Protein malfunction and disease	Disrupts an $\alpha$ -helix
p.Thr135Ala	0.996	Non-disease-associated	Near a Ca <sup>2+</sup> binding site; alters internal hydrogen bonds
p. Glu272Lys	0.999	Non-disease-associated	Alters charge; disturb ionic interactions
p.Arg282Leu <sup>2</sup>	1	Protein malfunction and disease	Alters hydrophobicity and charge on protein surface Alters hydrophobicity and charge; Factor X and thrombin binding site
p.Arg372Cys <sup>2</sup>	0.999	Non-disease-associated	site
p.Arg372His <sup>2</sup>	0.998	Non-disease-associated	Alters charge; Factor X and thrombin binding site
p.Gly479Arg	1	Non-disease-associated	Incorrect torsion angles; alters charge and core protein structure
p. Arg527Trp <sup>2</sup>	0.998	Non-disease-associated	Alters hydrophobicity and charge on protein surface
p. Arg593Cys <sup>2</sup>	0.999	Non-disease-associated	Alters hydrophobicity and charge
p.Ala704Thr	0.996	Protein malfunction and disease	Loss of hydrophobic interactions in the core of the protein
p.Glu720Lys	0.174	Non-disease-associated	Alters charge on protein surface Alters hydrophobicity; leads to an empty space in the core of the protein
p.Ile1679Thr	0.948	NA <sup>3</sup>	protein

**Table 2.** (Cont.)

Mutation <sup>1</sup>	Polyphen (score)	Site Direct Mutator prediction (SDM)	Putative deleterious effect
			(HOPE and present bioinformatic analysis)
p.Arg1689Cys <sup>2</sup>	1	Non-disease-associated	Alters hydrophobicity and charge; vWF and thrombin binding site
p.Arg1749Cys <sup>2</sup>	0.996	Non-disease-associated	Alters hydrophobicity and charge on protein surface
p.Arg1781His <sup>2</sup>	0.998	Non-disease-associated	Alters charge in the core of the protein
p.Arg1941Gln <sup>2</sup>	0.999	Non-disease-associated	Alters charge in the core of the protein; Near a FIX binding site
p.Gly1994Arg	1	Non-disease-associated	Incorrect torsion angles; alters charge and core protein structure
p.Arg2150Leu <sup>2</sup>	0.999	Protein malfunction and disease	Alters hydrophobicity and charge; disturbs correct folding
p.Cys2169Tyr	1	Non-disease-associated	Loss of a cysteine bond
p.Pro2292His	0.966	Protein malfunction and disease	Alters hydrophobicity on protein surface; disturbs a rigid conformation

<sup>1</sup> Sequence changes at protein level according to the HAMSTeRS database. The first alanine of the mature protein is numbered as 1.

<sup>2</sup> The majority of the mutated amino acids are arginine residues, which are codified by a triplet where cytosine demethylation occurs, representing a hotspot for mutations.

<sup>3</sup> NA: the prediction is not available due to the absence of the tridimensional structure of the B domain.

**Table 3.** New F8 gene mutations described in this study.

N° of patients <sup>1</sup>	Nucleotide change <sup>2</sup>	Amino acid change <sup>3</sup>	Amino acid change <sup>4</sup>	Exon/intron	FVIII domain
1	c.853 G>A	p.Val285Met	p.Val266Met	7	A1
1	c.968 G>T	p.Gly323Val	p.Gly304Val	7	A1
1	c.1757 T>A	p. Met586Lys	p. Met567Lys	12	A2
1	c.2006 C>A	p. Ser669Tyr	p. Ser650Tyr	13	A2
1	c.5347 A>G	p.Arg1783Gly	p.Arg1764Gly	15	A3
4	c.5414 A>T	p.Tyr1805Phe	p.Tyr1786Phe	16	A3
1	c.5432 A>G	p.Tyr1811Cys	p.Tyr1792Cys	16	A3
1	c. 6430-1_6430-4delACAG	-	-	IVS22	-
	c. 6430-8_6430-16delTAATCTCTC	-	-	IVS22	-

<sup>1</sup> Number of independent patients carrying the same mutation.

<sup>2</sup> DNA mutation numbering is based on cDNA sequence , with nucleotide +1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon.

<sup>3</sup> Sequence changes at protein level following the Nomenclature for Description of Genetic Variations approved by the Human Genome Variation Society.

<sup>4</sup> Sequence changes at protein level according to HAMSTeRS database. The first alanine of the mature protein is numbered as 1.

**Table 4.** Patients' profile and characteristics of new mutations described in this study.

Mutation <sup>1</sup>	Clinical severity	Family history	Other known	
			mutations at the same site	Conservation (h/p/m/c) <sup>2</sup>
p.Val266Met	Mild	Familial	p.Val285Gly; p.Val285Ala	V/V/I/V
p.Gly304Val	Moderate	Familial	p.Gly323Glu	G/G/G/G
p. Met567Lys	Moderate	Familial	p.Met586Val	M/M/M/M
p. Ser650Tyr	Moderate	Sporadic	none	S/S/S/S
p.Arg1764Gly	Mild	Familial	p.Arg1783Thr	R/R/R/R
p.Tyr1786Phe	Mild	Familial	p.Tyr1805Ser; p.Tyr1805stop	Y/Y/Y/Y
p.Tyr1792Cys	Mild	Familial	p.Tyr1811Stop	Y/Y/Y/Y
c. 6430-1_6430-4delACAG	Moderate	Familial	none	-
c. 6430-8_6430-16delTAATCTCTC	Moderate	Familial	none	-

<sup>1</sup> Sequence changes at protein level according to HAMSTeRS database. The first alanine of the mature protein is numbered as 1.

<sup>2</sup> h-human; p-porcine; m-murine; c- canine.



**Table 5.** Predicted effect of new missense mutations on the FVIII protein detected in this study.

Mutation <sup>1</sup>	Site Direct Mutator prediction		Putative deleterious effect
	Polyphen (score)	(SDM)	(HOPE and present bioinformatic analysis)
p.Val266Met	0.969	Non-disease-associated	Near a Cu <sup>2+</sup> binding site
p.Gly304Val	1	Non-disease-associated	Incorrect torsion angles; near FX binding site Near FIXa binding site; loss of hydrophobic interactions;
p. Met567Lys	0.991	Non-disease-associated	repulsion
p. Ser650Tyr	0.998	Non-disease-associated	Alters internal hydrogen bonds Alters core protein structure; disturb correct folding; near vWF
p.Arg1764Gly	0.996	Non-disease-associated	and FIX binding sites Alters internal hydrogen bonds and core protein structure; near
p.Tyr1786Phe	0.917	Non-disease-associated	vWF and FIX binding sites Alters internal hydrogen bonds and core protein structure; near
p.Tyr1792Cys	0.8	Protein malfunction and disease	vWF and FIX binding sites

<sup>1</sup> Sequence changes at protein level according to HAMSTeRS database. The first alanine of the mature protein is numbered as 1.

**Table 6.** Change of properties and location of mutant amino acids not previously described in HAMSTeRS.

<b>Mutation</b>	<b>Type of amino acid substitution<sup>1</sup></b>	<b>Amino acid charge substitution</b>	<b>Location/accessibility<sup>2</sup></b>
p.Val285Met	O > O	-	Loop/partially accessible
p.Gly323Val	O > O	-	Loop/accessible
p. Met586Lys	O > I	neutral > positive	Loop/accessible
p. Ser669Tyr	I > I	-	Loop/buried
p.Arg1783Gly	I > O	positive > neutral	Loop/buried
p.Tyr1805Phe	I > O	-	Loop/partially accessible
p.Tyr1811Cys	I > O	-	Loop/accessible

<sup>1</sup> Type of amino acid substitution: O- hydrophobic; I- hydrophilic.

<sup>2</sup> Location/accessibility of wild type amino acid.

**Table 7.** Polymorphic changes found in this study and their allele frequencies in patients and controls.

<b>Polymorphism</b>	<b>Amino acid substitution</b>	<b>Exon/intron</b>	<b>Patients<sup>1</sup> n = 76</b>	<b>Controls<sup>1</sup> n = 100</b>	<b>Previously described?</b>
c.388 - 9C>T	-	IVS3	0.19	Absent	Yes
c.1010 - 27G>A	-	IVS7	0.04	0.10	Yes
c.3780 C>G	p.D1241E	Exon 14	0.30	0.17	Yes
c.3864 A>C	p.S1269S	Exon 14	0.10	0.13	Yes
c.5373 - 18_5373 -19insT	-	IVS15	0.02	0.03	No <sup>2</sup>
c.5998 + 91T>A	-	IVS18	0.31	0.36	Yes
c.6769 A>G	p.M2238V	Exon 25	0.08	0.05	Yes
c.8728 A>G	-	3'UTR	0.25	0.28	Yes

<sup>1</sup> Allele frequencies for all polymorphisms do not significantly differ in patients and controls.

<sup>2</sup> This change was considered a polymorphism since it is found in healthy controls and does not affect a splice site.

**Table 8.** Haplotype analysis in patients with recurrent F8 gene mutations in our population.

<b>Recurrent mutation</b>	<b>Amino acid substitution <sup>1</sup></b>	<b>N° of patients with the same mutation</b>	<b>N° of patients with an identical haplotype <sup>2</sup></b>	<b>N° of putative independent mutational events</b>
c.902 G>T	p.Arg282Leu	2	2	1
c.1636 C>T	p. Arg527Trp	4	3	2
c.1834 C>T	p. Arg593Cys	7	5	3
c.3637delA	p.Ile1194Phe	2	2	1
c.5093 T>C	p.Ile1679Thr	16	16	1
c.5122 C>T	p.Arg1689Cys	2	2	1
c.5302 C>T	p.Arg1749Cys	7	7	1
c.5414 A>T	p.Tyr1786Phe	4	4	1
c.6932 C>A	p.Pro2292His	2	2	1

<sup>1</sup> Sequence changes at protein level according to HAMSTeRS database. The first alanine of the mature protein is numbered as 1

<sup>2</sup> Control frequencies of dinucleotides, tetranucleotides and *Hind III* polymorphisms are available on request. Control group did not present any identical haplotype.

**Figure 1.** Localization of the novel FVIII protein missense mutations found. Mutations depicted in red occur in moderate patients and those depicted in green in mild haemophilia A patients. The side chain of wild-type amino acids is shown in zoom, with those of mutant amino acids shown besides or under the wild-type. Yellow circles represent calcium ions and red circles copper ions. The binding sites for activated factor IX [11,12] are portrayed in light blue.

**Figure 2.** Left, the FVIII activated molecule, with its A2 domain in red. Right, above, the Met567 wild and below the Lys567 mutated residues. Near the mutated structure there is a pronounced positively charged area. Blue, positive; red, negative; white, neutral charges. Charge values calculated vary between -10 (red) and +10 (blue) kiloteslas.

**Figure 3.** Left, the FVIII activated molecule, with its A3 domain in red. Right, above, the Arg1764 wild and below the Gly1764 mutated residues. Near the mutated structure there is a pronounced negatively charged area. Blue, positive; red, negative; white, neutral charges. Charge values calculated vary between -10 (red) and +10 (blue) kiloteslas.

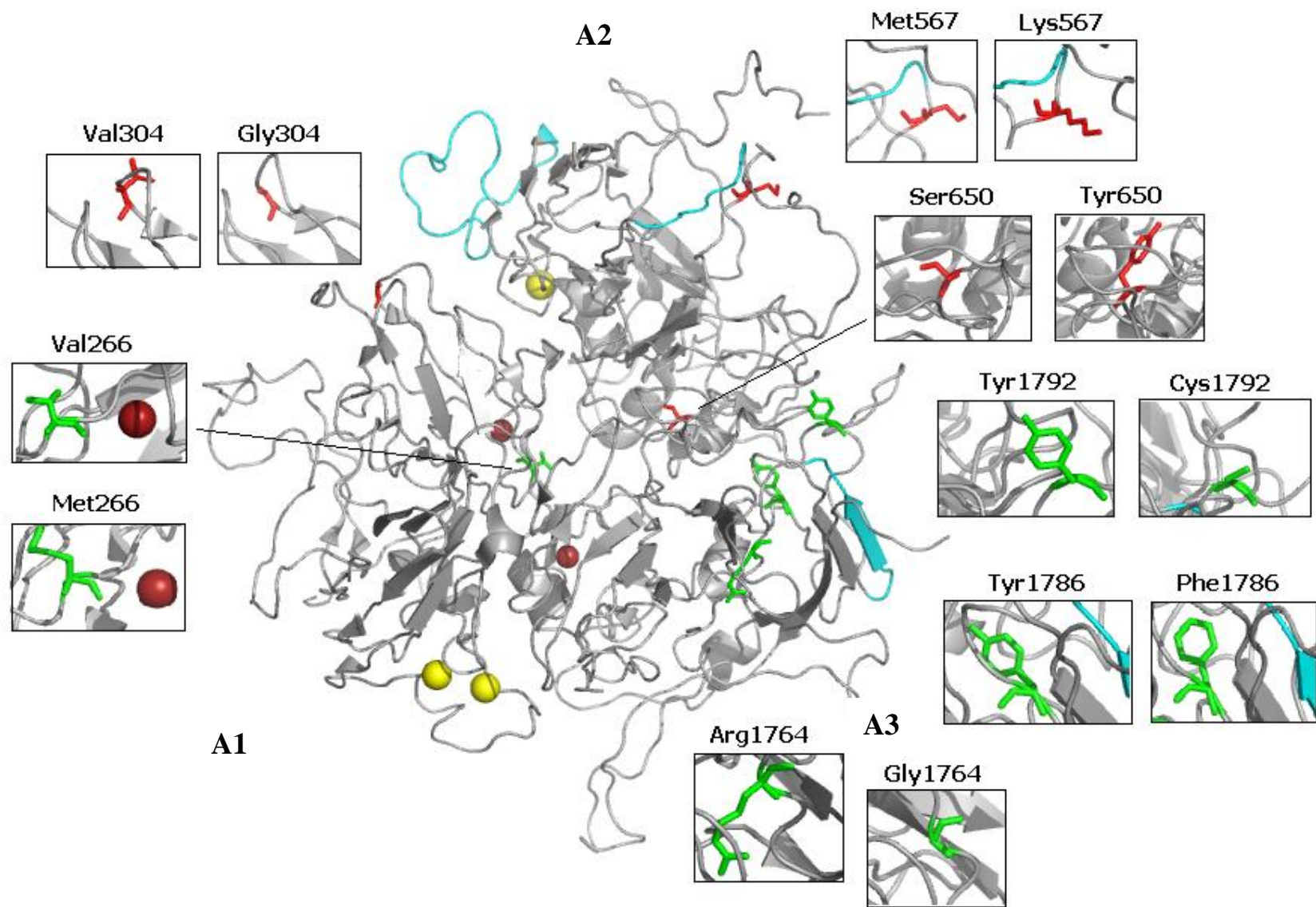


Figure 1

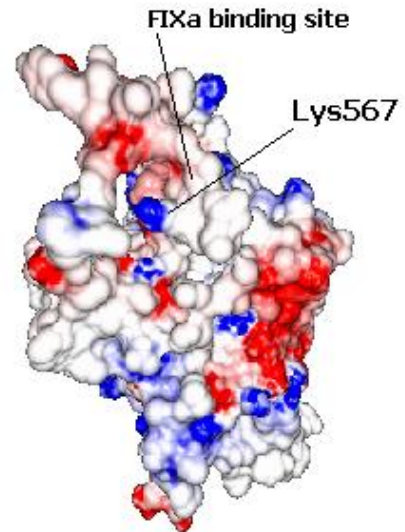
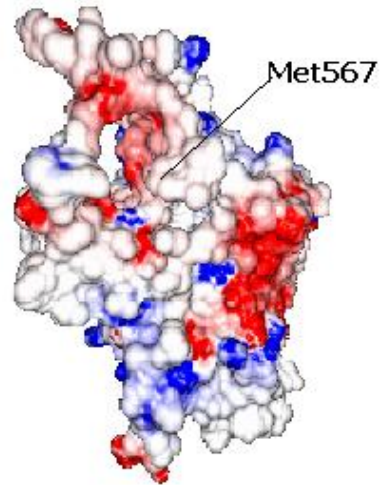
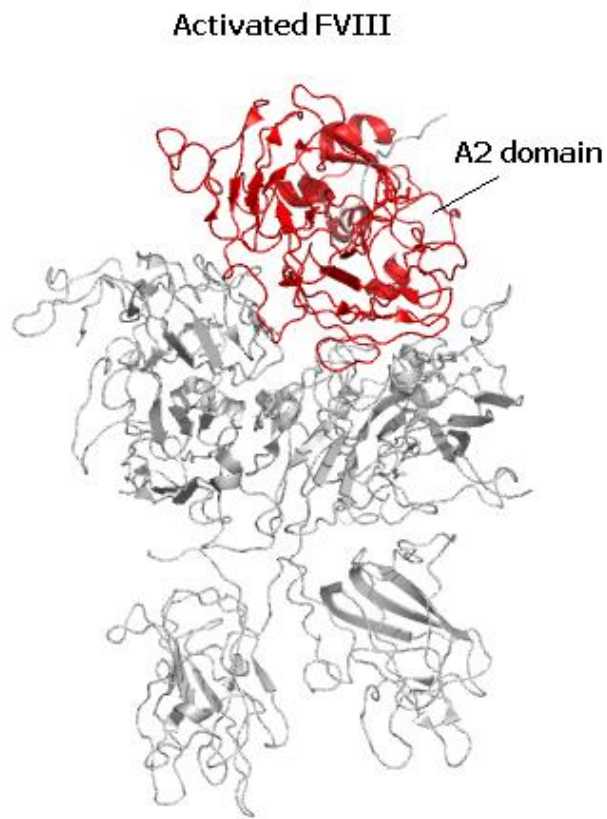


Figure 2

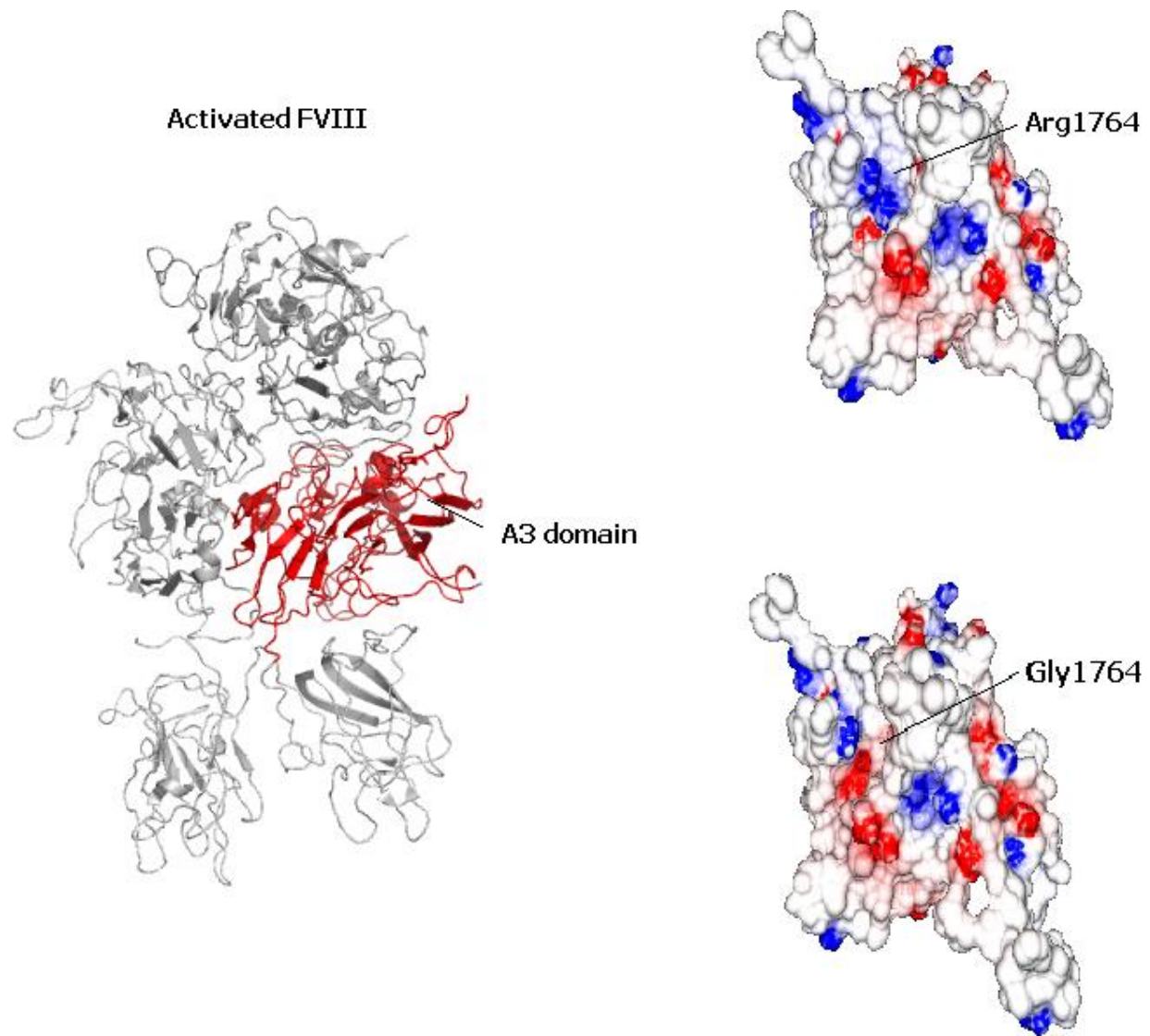


Figure 3



**CAPÍTULO 3 - FACTOR VIII MUTATIONS AND INHIBITOR FORMATION IN A  
SOUTHERN BRAZILIAN POPULATION**

---

Artigo submetido para publicação na revista *Journal of Thrombosis and Haemostasis*.

## **Factor VIII mutations and inhibitor formation in a southern Brazilian population**

C. ROSSET<sup>1</sup>, R. P. GORZIZA<sup>1</sup>, M. R. BOTTON, F. M. SALZANO and E. BANDINELLI

Genetics Department, Biosciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

**Running title:** FVIII mutations and inhibitor formation

<sup>1</sup> These authors contributed equally to the study.

---

**Correspondence to:** Francisco M. Salzano, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil, Tel.: +50 51 33086747, Fax: +50 51 33089823, E-mail: francisco.salzano@ufrgs.br

Inhibitor development is the main complication of haemophilia A treatment, interfering with Factor VIII (FVIII) therapy. Several extrinsic and intrinsic factors have been identified as influencing this phenomenon, but many details of the fine interactions are missing. About 15-25% of haemophilia A patients develop inhibitory antibodies overall [1]. In South Brazil, inhibitors incidence in severe haemophilia A patients was estimated at 40% [2]. The aim of the present study was to analyze the relationship between inhibitor development and F8 gene mutations type and location in South Brazilian haemophilia A patients.

We have studied a total of 110 patients with severe (n=43), moderate (n=15) or mild (n=52) haemophilia A, aged between 1-71 years (mean age = 23.8 years) ascertained in HEMOCENTRO-RS, a central haemotherapy institution for the state of Rio Grande do Sul, Brazil. They had their F8 gene and inhibitor status investigated [3,4], but no formal statistical analysis between the two sets of characteristics had been made. The present report describes such analysis. Individuals with intron 1 and intron 22 inversions (previously detected in [2]) were excluded from the analysis, since these mutations are already known as causing high inhibitor incidence [5]. Inhibitors were identified through the Bethesda method [6], and an inhibitor titer >1 UB/ml was considered positive. Pearson chi-square tests with exact probability values were calculated using the SPSS software version 18.0, and exact P-values less than 0.05 were considered statistically significant. The study was approved by our ethics institutional review board and all patients or legal representatives signed a written informed consent.

A total of 19% of the patients had inhibitory antibodies. This result is higher than that reported by Astermark *et al.* [7], who obtained a prevalence of 10–15% for the development of inhibitory antibodies against FVIII in all types of patients with HA, despite the fact that their prevalence of severe cases (76% in 164 patients) was much higher than ours (39%).

Inhibitor development in the severe type of haemophilia in our study, however, was of the same order of magnitude as that reported by them (42% vs. 47%).

Table 1 presents the information for our series of patients considering their clinical picture, the domains or introns in which the mutations were located, the specific mutations that showed a statistically significant association with inhibitor formation, and a global reference to the others where the association was not found. There is heterogeneity in inhibitor prevalences across domains ( $\chi^2 = 15.9$ , 8df,  $P = 0.043$ ), and those in which inhibitors were found with higher frequency were C1 (14.3% of the mutation carriers with and 2.2% without inhibitors) and B (28.6% vs 11.2%, respectively).

When specific mutations showing association with inhibitor formation are considered (identified by residual analyses), 12 were detected. Significant heterogeneity was also found for the mutation analysis ( $\chi^2 = 74.6$ , 8df,  $P = 0.027$ ). Six of them (p.Phe51\*; p.Gly549Alafs\*9; p.Ile1032Argfs\*3; p.Phe1958Serfs; p.Leu1655Phefs\*18 and p.Ala1627Glnfs\*17) involved small (less than 50bp) and one (Del exons 4, 5 and 6) large deletions (higher than 50bp). Two of them (p.Arg795\* and p.Arg2147\*) are nonsense mutations due to premature stop codons, respectively in the B and C1 domains; the first is responsible for plasma secretion and protein folding, and the latter is located in the light chain and helps the coagulation process. Two of them are insertions, one with six bp (p.Asn2141\*), and another with 1bp (p.Asn1441Lysfs\*2) located in the C1 and the B domains, respectively. The p.Asn1441Lysfs\*2 mutation occurs both in one severe and one moderate patient, probably because plasma levels are influenced by many polymorphisms in F8, and this fact may have contributed to the different assignment made. Finally, one missense mutation (p.Leu2297Arg), located in the C2 domain, was first described in our population [3]. It introduces a pronounced positively charged area in the central region of the protein which could lead to a new epitope for FVIII antibody binding.

Previous studies have generally associated inhibitor formation with the same type of mutations observed by us as leading to higher risk (intronic 22 and 1 inversions, not considered in this report, deletions and nonsense mutations) [3], but frequencies concerning the risk for specific mutations are practically lacking. Only qualitative (presence or absence) information is given, and this is not surprising, since, due to the gene's high mutation rate, frequencies of any given mutation are small. Anyway, column 6 of Table 1 indicates whether those mutations identified by us as of potential risk were or were not previously found associated with the presence of inhibitors. In six of them the comparison was possible; of these, three are concordant with previous findings and three are discordant. Mutations p.Gly549Alafs\*9, p.Ile1032Argfs\*3, p.Ala1627Glnfs\*17, p.Leu1655Phefs\*18, p.Phe1958Serfs, p.Asn2141\* and p.Leu2297Arg could not be compared with earlier studies, since they were first described in our patients.

The information reported here is important for comparative purposes with series located in other countries, in which patients with different genetic constitutions and environmental factors occur. It is also important for patient management, specifically in terms of early prevention of this important clinical problem.

We would like to thank Ana M. C. B. Pereira and Ana P. Ornaghi for laboratory help, as well as the patients and staff of HEMOCENTRO-RS for agreeing to participate in the study and for logistical support. Financing was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Apoio a Núcleos de Excelência Program).

#### **Disclosure of conflict of interests**

There are no conflicts of interest.

## References

- 1 Ragni MV, Ojeifo O, Feng J, Yan J, Hill KA, Sommer SS, Trucco MN, Brambilla DJ, Hemophilia Inhibitor Study. Risk factors for inhibitor formation in haemophilia: a prevalent case-control study. *Haemophilia* 2009; **15**: 1074 - 82.
- 2 Leiria LB, Roisenberg I, Salzano FM, Bandinelli E. Introns 1 and 22 inversions and factor VIII inhibitors in patients with severe haemophilia A in southern Brazil. *Haemophilia* 2009; **15**: 309-313.
- 3 Gorziza RP, Vieira IA, Kappel DB, Rosset C, Sinigaglia M, Leiria LB, Salzano FM, Bandinelli E. Genetic changes in severe haemophilia A: new contribution to the aetiology of a complex disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2013; **24**: 164-9.
- 4 Rosset C, Vieira IA, Sinigaglia M, Gorziza RP, Salzano FM, Bandinelli E. Detection of new mutations and molecular pathology of mild and moderate Haemophilia A patients from southern Brazil. [Submitted].
- 5 Kempton CL & White GC. How we treat a hemophilia A patient with a factor VIII inhibitor. *Blood* 2009; **113**: 11-17.
- 6 Kasper CK, Aledort LM, Aronson D, Counts RB, Edson JR, Frantoni J, Green D, Hampton J, Hilgartner M, Levine P, Lazerson J, McMillan C, Penner J, Shapiro S, Shulman NR. A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh* 1975; **34**:869-872.
- 7 Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Bemtorp E. Polymorphism in the IL10 but not in the IL1 beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 2006; **107**: 3167-72.

**Table 1.** Factor 8 gene mutations and inhibitor prevalence in our series of patients.

Severity	Domain/intron	Mutations <sup>1</sup>	HAMSTeRS <sup>2</sup>		
			With inhibitor (%)	Without inhibitor (%)	information whether inhibitors were present in carriers
Severe	A1	c.209-212 del	3(14.3)	3 (3.4)	Yes
		TTGT; p.Phe51*			
	Multi	5 different	2 (9.5)	6 (6.9)	N/A
		Del exons 4, 5 and 6	1 (4.7)	0 (0)	No
	A2	c.1703 del G; p.Gly549Alafs*9	1 (4.7)	0 (0)	N/A
		5 different	1 (4.8)	3 (3.4)	N/A
	B	p.Arg795*	2 (9.5)	1 (1.1)	Yes
		c.3152-3156 del TATTA ; p.Ile1032Argfs*3	1 (4.8)	0 (0)	N/A
	A3	c.4380 ins A; p.Asn1441Lysfs*2	1 (4.8)	0 (0)	No
		c.4936 del G; p.Ala1627Glnfs*17	1 (4.7)	0 (0)	N/A
	C1	c.5019 del T; p.Leu1655Phefs*18	1 (4.7)	0 (0)	N/A
		3 different	0 (0)	5 (5.7)	N/A
	C2	c.5930 del T; p.Phe1958Serfs	1 (4.8)	0 (0)	N/A
		2 different	0 (0)	2 (2.2)	N/A
	C1	c.6473-6478 ins ATTTTT; p.Asn2141*	1 (4.8)	0 (0)	N/A
		p.Arg2147*	2 (9.5)	0 (0)	Yes
	C2	p.Leu2297Arg	1 (4.8)	0 (0)	N/A
		2 different	0 (0)	3 (3.4)	N/A
	IVS15	1	1 (4.8)	0 (0)	N/A

**Table 1.** (Cont).

Severity	Domain/intron	Mutations <sup>1</sup>	HAMSTeRS <sup>2</sup>		
			With inhibitor (%)	Without inhibitor (%)	information whether inhibitors were present in carriers
Moderate	A1	2 different	0 (0)	3 (3.4)	N/A
	a1	1	0 (0)	1 (1.1)	N/A
	A2	2 different	0 (0)	2 (2.2)	N/A
	B	c.4380 ins A; p.Asn1441Lysfs*2	1 (4.8)	0 (0)	No
	A3	2 different	0 (0)	2 (2.2)	N/A
	Mild	C1	1	0 (0)	1 (1.1)
	IVS20	1	0 (0)	1 (1.1)	N/A
	IV22	1	0 (0)	1 (1.1)	N/A
	A1	4 different	0 (0)	4 (4.5)	N/A
	a1	1	0 (0)	1 (1.1)	N/A
	A2	3 different	0 (0)	12 (13.5)	N/A
	B	2 different	0 (0)	2 (2.2)	N/A
	a3	2 different	0 (0)	18 (20.2)	N/A
	A3	5 different	0 (0)	12 (13.5)	N/A
	C1	1	0 (0)	1 (1.1)	N/A
	C2	1	0 (0)	2 (2.2)	N/A
<b>Total</b>	-	-	<b>21</b>	<b>89</b>	-

<sup>1</sup>(c.) DNA mutation numbering based on cDNA sequence, with nucleotide +1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon; (p.) Sequence changes at protein level according to the HAMSTeRS database. The first alanine of the mature protein is numbered as 1.

<sup>2</sup>HAMSTeRS: Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site. Available at: <http://hadb.org.uk/> (last accessed on 20 February 2013).

N/A: Not applicable.



Embora exista um grande número de trabalhos publicados que descrevem mutações (Tuddenham & Copper, 1994), realizados em diferentes populações de hemofílicos A, o estudo das mesmas permanece sendo importante, pois possibilita uma melhor compreensão da genética molecular da doença na população estudada. Além disso, a identificação de mutações no gene do FVIII e das variantes correspondentes fornece ferramentas importantes para análises bioquímicas e predição de alterações na estrutura tridimensional da molécula do FVIII, melhorando a compreensão da relação genótipo/fenótipo e sugerindo mecanismos causais diferentes para a hemofilia A (D' Oiron *et al.*, 2008). A disponibilidade de técnicas de biologia molecular junto com o diagnóstico laboratorial da hemofilia possibilitaram a caracterização da doença com um grau de detalhe muito aprofundado. O diagnóstico molecular é útil na realização de testes pré-natais em famílias com história de HA, na identificação de mulheres heterozigotas para as mutações e que desejam ter filhos, na determinação da mutação em casos esporádicos, na determinação das características da doença e risco de recorrência. Assim é possível oferecer aconselhamento genético e suporte psicológico e emocional para a família. Além disso, a informação sobre o tipo de mutação pode influenciar na terapia do paciente, visando à prevenção de complicações no tratamento. Nesse caso, algumas mutações oferecem maior risco de desenvolvimento de inibidores, e os pacientes que apresentarem essas mutações podem receber terapias diferenciadas. Embora pacientes com grandes deleções, mutações sem sentido e a inversão do íntron 22 apresentem maior chance de desenvolvimento de inibidores, algumas mutações específicas de sentido trocado, localizadas principalmente nos domínios C1 e C2 da cadeia leve e no domínio A2 da cadeia pesada da molécula do FVIII, estão associadas a uma elevada e inesperada incidência de inibidores. Entre essas mutações está uma encontrada em nosso estudo, p. Arg593Cys, onde há um maior risco de desenvolvimento de inibidores. Os sete pacientes de nosso estudo com esta mutação, no entanto, não desenvolveram inibidores até o momento. Devido a esse aumento de risco, eles continuarão a ser monitorados, visando uma detecção precoce do problema. A ausência de inibidores neles e nos outros pacientes corroboram estudos anteriores, que indicaram a baixa prevalência dessa condição nas formas leve ou moderada de hemofilia A.

Foi também realizada uma avaliação geral dos hemofílicos de diferentes quadros clínicos localizados e estudados por nosso grupo e a presença de inibidores anti-FVIII.

Verificamos uma associação estatisticamente significativa com relação aos domínios em que as mutações ocorrem, havendo uma frequência mais alta nos domínios B e C1. Além disso, uma grande (maior que 50pb) e seis pequenas (menores que 50pb) deleções, bem como duas mutações sem sentido, duas inserções e uma de sentido trocado mostraram uma associação indicativa de maior suscetibilidade à formação de inibidores. Estudos como esse são importantes para comparação com séries de outros países, nos quais os pacientes têm constituições genéticas diferentes e vivem em ambientes diversos. Além disso, eles fornecem informação para uma eventual prevenção precoce desse tipo importante de problema clínico.

O presente trabalho detectou a mutação causadora da doença em 69 dos 76 pacientes analisados, sendo que sete mutações de sentido trocado e duas mutações em sítios de processamento de RNAm não tinham sido ainda descritas na literatura. Os preditores utilizados para a análise *in silico* forneceram resultados confiáveis, indicando que através do estudo de controles saudáveis, a verificação da conservação da estrutura em outras espécies, das trocas de propriedades de aminoácidos selvagens e mutantes, e dos mapas de cargas, é possível avaliar de maneira eficiente os efeitos das mutações no FVIII. Em todas as nove mutações novas descritas, foi possível verificar que elas causam a doença e afetam de alguma forma a função ou a estrutura do FVIII. A mutação p.Val266Met está localizada na interface entre os domínios A2 e A3, ao lado de um sítio de ligação ao cobre (His267 / Cys310 / His315 / Met320). Os íons desse metal têm o papel de aumentar a afinidade entre os domínios em aproximadamente 100 vezes (Wakabayashi *et al.*, 2001). Por outro lado, identificamos mutações novas que podem afetar interações com o FX no domínio A1, com o FIX no domínio A2 e com o FIX e FvW no domínio A3. Além desses efeitos de perda de interações, as pontes de hidrogênio, o tamanho, a hidrofobicidade e a carga de regiões da proteína foram também afetadas por algumas dessas novas mutações. Os preditores de sítios de processamento também forneceram resultados confiáveis. As deleções e duplicações detectadas têm um efeito claro, pois afetam diretamente a fase de leitura da proteína.

Alguns pacientes deste estudo não apresentaram sintomas condizentes com o nível de FVIII em seu plasma. Por exemplo, um paciente com a mutação p.Arg527Trp, com FVIII:C de 13U/dl apresentava hemartroses, um sintoma de HA grave. Como o FVIII não é uma enzima, mas sim um cofator na ativação do FX pelo FIXa, todos os ensaios de dosagem atualmente disponíveis medem a capacidade do FVIII:C de gerar FXa na presença de íons cálcio e fosfolípidios (Lenting *et al.*, 1998); e o teste mais utilizado para dosagem de FVIII:C no diagnóstico de hemofilia A, e o que utilizamos, é o método de um estágio descrito por Austen & Rhymes (1975). Ele baseia-se na correção do TTPA de um plasma deficiente de

FVIII por meio de diluições do plasma do paciente. Um dos principais problemas deste método é que a atividade do FVIII é medida de forma indireta através da avaliação da formação de fibrina na cascata de coagulação *in vitro*. A simplicidade do método, bem como a ampla disponibilidade de reagentes e a facilidade de automação são as principais razões pelas quais este ensaio é muito utilizado em laboratórios clínicos. Apesar disso, demonstrou-se que este ensaio é sujeito a alguma variabilidade, embora seja confiável na maioria dos casos (Oldenburg & Pavlova, 2010).

Como alternativas na dosagem de FVIII:C, existem os ensaios de duas fases clássicos e os ensaios cromogênicos. Nestes ensaios, o FX é ativado pelo FIX na presença do FVIII, íons cálcio, FVa e fosfolipídios. O FXa formado é medido em um segundo passo, quer num sistema de coagulação (conversão de fibrinogênio em fibrina no ensaio de duas fases clássico) (Barrowcliffe, 1984) ou pela clivagem enzimática de um substrato cromogênico do FXa que é fotometricamente quantificado (ensaio cromogênico) (Rosen, 1984).

Na maioria dos casos, a medição do FVIII: C por diferentes ensaios oferece resultados equivalentes, mas já foram descritos casos de discrepâncias entre os ensaios. Até 30% dos hemofílicos A leves e moderados parecem exibir discrepância (Poulsen *et al.*, 2009). A explicação para a ocorrência dessa discrepância é a rápida dissociação da subunidade A2 do FVIII em condições fisiológicas, o que correlaciona-se com a perda da atividade pró-coagulante. Várias mutações têm sido associadas com este fenômeno. Algumas estão associadas com resultados de atividade de FVIII mais altas no método de um estágio do que nos outros, entre elas AlaGlu284, Ala284Pro, Ser289Leu, Arg527Trp, Arg531His, Arg698Leu, Arg698Trp, Leu1,932Phe, Met1947Ile, His1954Leu (Oldenburg e Pavlova, 2010). O mecanismo molecular para uma destas mutações, Arg531His, foi caracterizado como devido à maior dissociação da subunidade A2 (Pipe *et al.*, 2001). Quatro pacientes em nosso trabalho apresentaram a mutação p. Arg527Trp, dois deles com sintomas discrepantes entre o quadro clínico e o nível de FVIII.

Para outras mutações, a discrepância é invertida, com os resultados dos ensaios de dois estágios ou cromogênicos fornecendo valores maiores do que o ensaio de um estágio. Uma série de mutações de sentido trocado, incluindo Glu321Lys, Thr346Cys, Glu720Lys, Arg1639His, Arg1689His, Ile369Thr e Ser2127Phe, foram descritas como associadas com esta discrepância. Dentre essas, verificou-se que o FVIII recombinante purificado com a substituição Glu720Lys requer concentrações mais elevadas de FIXa para atingir a plena atividade de cofator (Roelse *et al.*, 1999). Essa mutação foi encontrada em um paciente de nosso estudo, e está localizada na região acídica entre os domínios A2 e B, podendo resultar

na diminuição da afinidade do FVIIIa pelo FIXa ou na redução da atividade catalítica do FIXa por outro mecanismo. Se ela introduz um defeito na formação do complexo tenase pela diminuição da afinidade ao FIXa, o excesso de FIXa, junto com o maior tempo de incubação necessário nos ensaios de duas fases, pode levar à ativação do FVIII mesmo quando a afinidade pelo FIXa está reduzida, explicando o resultado discrepante. A mutação p.Arg1689His, observada por nós em dois pacientes, também estava associada em um deles com um resultado discrepante.

Cerca de 2-3% dos pacientes com HA não possuem diagnóstico molecular estabelecido, mesmo utilizando as abordagens mais avançadas para a análise do gene, incluindo a técnica de *MLPA*. No nosso estudo não foi encontrada nenhuma mutação causadora da doença em sete pacientes (9%), uma taxa um pouco mais alta que a esperada. Nesses casos, uma mutação pode existir em regiões intrônicas não conservadas distantes das junções éxon-ínton, as quais não foram aqui investigadas e podem afetar o processamento ou regulação gênica, levando à redução dos níveis de RNAm. Outras possibilidades são a influência de outras mutações e polimorfismos herdados em conjunto, efeitos epistáticos de outros *loci*, como a co-herança de trombofilia, alterações no sistema fibrinolítico e anticorpos antifosfolipídios (Shetty *et al.*, 2007; Franchini *et al.*, 2009) ou alterações nos genes *LMAN1* (*lectin manose binding 1*) e *MCFD2* (*multiple coagulation factor deficiency 2 protein*), responsáveis pelo transporte intracelular do FVIII do retículo endoplasmático para o aparelho de Golgi.

As mutações no FVIII também podem ser recorrentes dentro de uma mesma população, o que geralmente é explicado por um efeito fundador, tendo a mutação se multiplicado em gerações sucessivas. A evidência para esse fato pode incluir confinamento dos portadores na mesma área geográfica, ou a presença de haplótipos polimórficos idênticos em todos os pacientes afetados, independentemente da distribuição geográfica. Essas mutações normalmente causam doença moderada ou leve, pois uma mutação que causa doença grave tem uma baixa probabilidade de sobrevivência durante muitas gerações. Nesse estudo foram encontradas nove mutações recorrentes em 46 pacientes, e a análise de haplótipos foi feita para avaliar se essas mutações teriam ocorrido *de novo* através de eventos separados ou se elas teriam derivado de um ancestral comum. Os resultados sugerem que em sete das nove mutações recorrentes deve ter ocorrido apenas um evento mutacional.

O nosso estudo indicou a causa da doença em 69 (91%) dos 76 hemofílicos sem parentesco próximo, tendo sido detectadas nove mutações novas: sete mutações de sentido trocado e duas em sítios de processamento de RNAm. A estratégia utilizada indicou que pode ser verificada de uma forma relativamente rápida qual a relação entre a mutação encontrada no gene do F8 e o seu efeito na proteína FVIII. Várias das mutações de sentido trocado devem ter sido introduzidas na população brasileira por um efeito fundador, e, dessa forma, representam a base molecular da hemofilia A em um número considerável de pacientes. Essas mutações, em conjunto com as mutações que ocorrem *de novo*, levam a diferenças significativas no espectro de mutações do F8 em diferentes populações. A identificação das novas mutações reforça indicações anteriores sobre a alta mutabilidade do gene do F8, e contribui para fornecer novos subsídios à compreensão da patologia molecular da hemofilia A. Além disso, este e outros estudos de nosso grupo têm grande importância para o cuidado com os pacientes, especialmente no seu monitoramento quanto à formação de inibidores anti-FVIII, representando um grande incentivo à instituição, no futuro, do aconselhamento genético, melhora no diagnóstico e detecção de heterozigotas.

Como perspectivas da continuidade desse trabalho pode-se mencionar o uso de novas abordagens a fim de esclarecer a causa da doença em pacientes sem mutações detectadas nas regiões analisadas; o estudo funcional das mutações novas encontradas; e a análise do RNAm de pacientes com novas mutações em sítios de processamento. A correta dosagem de FVIII:C no plasma dos pacientes com sintomas clínicos que discordam dos níveis de FVIII no plasma deverá ser realizada através de outro método de dosagem. Por fim, a identificação do efeito fundador nas mutações com ocorrência múltipla fornecerá novos dados à geografia da estrutura genética da população brasileira e sua história, um dos objetivos mais gerais de nossa equipe de investigação.

## Referências Bibliográficas

- Abu-Amro KK, Hellani A, Al-Mahed M, Al-Sheikh I (2008). Spectrum of factor VIII mutations in Arab patients with severe haemophilia A. *Haemophilia*, 14: 484-488.
- Acquila M, Pasino M, Lonza T, Bottini F, Molinari AC, Bicocchi MP (2004). Duplication of exon 13 causes one third of the cases of mild hemophilia A in northern Italy. *Haematologica*, 89:758-759.
- Adams TE, Hockin MF, Mann KG, Everse SJ (2004). The crystal structure of activated protein C-inactivated bovine factor Va: Implications for cofactor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 8918–8923.
- Agostini D, Rosset C, Botton MR, Kappel DB, Vieira IA, Gorziza RP *et al.* (2012) Immune system polymorphisms and factor VIII inhibitor formation in Brazilian haemophilia A severe patients. *Haemophilia*, 18:416-418.
- Ahmed RPH, Ivaskevicius V, Kannan M, Seifred E, Oldenburg J, Saxena R (2005). Identification of 32 novel mutations on the factor VIII gene in Indian patients with haemophilia A. *Haematologica*, 90: 283-284.
- Albáñez S, Ruiz-Sáez A, Boadas A, De Bosch N, Porco A (2011). Identification of factor VIII gene mutations in patients with severe haemophilia A in Venezuela: identification of seven novel mutations. *Haemophilia*, 17:913-918.
- Alexandre CO, Roisenberg I (1985). A genetic and demographic study of hemophilia A in Brazil. *Hum Hered*, 35:250-254.
- Amano K, Sarkar R, Pemberton S, Kemball-Cook G, Kazazian HH Jr, Kaufman RJ (1998). The molecular basis for cross-reacting material-positive hemophilia A due to missense mutations within the A2-domain of factor VIII. *Blood*, 91: 538–548.
- Antonarakis SS, and a Consortium of 65 international authors (1995). Factor VIII gene inversions in severe haemophilia A – results of an international consortium study. *Blood*, 86:2206-2212.
- Arruda VR, Pieneman WC, Reitsma PH, Deutz-Terlouw PP, Annichino-Bizzacchi JM, Briet E *et al.* (1995). Eleven novel mutations in the Factor VIII gene from Brazilian hemophilia A patients. *Blood*, 86: 3015-3020.
- Astermark J, Berntorp E, White GC, Kroner BL (2001). The MIBS Study Group. The Malmö International Brother Study (MIBS): further support for genetic predisposition to inhibitor development. *Haemophilia*, 7: 267–272.

- Astermark J (2006) Why do inhibitors develop? Principles of and factors influencing the risk for inhibitor development in haemophilia. *Haemophilia*, 12:52-60.
- Austen DEG, Rhymes IL (1975). A laboratory manual of blood coagulation. Blackwell Scientific, Oxford, pp.109.
- Awidi A, Ramahi M, Alhattab D, Mefleh R, Dweiri M, Bsoul N *et al.* (2010). Study of mutations in Jordanian patients with haemophilia A: identification of five novel mutations. *Haemophilia*, 16: 136-142.
- Bagnall RD, Waseem N, Green, PM, Giannelli F (2002). Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe haemophilia A. *Blood*, 99:168-174.
- Balleisen L, Bailey J, Epping PH, Schulte H, van de Loo J (1985). Epidemiological study on factor VII, factor VIII and fibrinogen in an industrial population. I: baseline data on the relation to age, gender, body-weight, smoking, alcohol, pill-using, and menopause. *Thromb Haemost*, 54:475–479.
- Barrow RT, Healey JF, Jacquemin M, Saint-Remy J-M, Lollar P (2001). Antigenicity of putative phospholipid membrane-binding residues in factor VIII. *Blood*, 97:169–174.
- Barrowcliffe TW (1984). Methodology of the two-stage assay of factor VIII (VIII:C). *Scand J Haematol Suppl*, 41: 25–38.
- Becker J, Schwaab R, Möller-Taube A, Schwaab U, Schmidt W, Brackmann HH *et al.* (1996). Characterization of the factor VIII defect in 147 patients with sporadic hemophilia A: family studies indicate a mutation type-dependent sex ratio of mutation frequencies. *Am. J. Hum. Genet.*, 58:657-670.
- Becker RC (2005). Cell-based models of coagulation: a paradigm in evolution. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 20: 65-68.
- Bihoreau N, Pin S, de Kersabiec AM, Vidot F, Fontaine-Aupart MP (1994). Copper-ion identification in the active and inactive forms of plasma-derived FVIII and recombinant FVIII-SII. *Eur J Biochem*, 220: 41-48.
- Boeckhorst J, Verbruggen B, Lavergne JM, Costa JM, Schoormans CM, Brons PT *et al.* (2005). Thirteen novel mutations in the factor VIII gene in the Nijmegen haemophilia A patient population. *Brit J of Haematol*, 131: 109-117.
- Bogdanova N, Markoff A, Eisert R, Wermes C, Pollmann H, Todorova A *et al.* (2007). Spectrum of molecular defects and mutation detection rate in patients with mild and moderate hemophilia A. *Hum Mutat*, 28: 54–60.
- Bolton-Maggs PHB, Pasi JK (2003). Haemophilias A and B. *Lancet*, 361: 1801-1809.

- Bovenschen N, Boertjes RC, van Stempvoort G, Voorber J, Lenting PJ, Meijer AB *et al.* (2003). Low density lipoprotein receptor-related protein and factor IXa share structural requirements for binding to the A3 domain of coagulation factor VIII. *J Biol Chem*, 278: 9370–9377.
- Bovenschen N, Rijken DC, Havekes LM, van Vlijmen BJ, Mertens K (2005). The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor. *J Thromb Haemost*, 3:1257-1265.
- Bowen DJ (2002). Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 55:127–144.
- Broze GJ (1995). Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. *Ann Rev Med*, 46:103-112.
- Butenas S, Mann KG (2002). Blood coagulation. *Biochemistry*, 67:5-15.
- Carlsson KS, Astermark J, Donfield S, Berntorp E (2008). Cost and outcome: comparison of two alternative bypassing agents for persons with haemophilia A complicated by an inhibitor. *Thromb Haemost*, 99: 1060-1067.
- Casaña P, Cabrera N, Cid AR, Haya S, Beneyto M, Espinós C *et al.* (2008). Severe and moderate haemophilia A: identification of 38 new genetic alterations. *Haematologica*, 90: 707-710.
- Castaman G, Giacomelli SH, Ghiotto R, Boseggia C, Pojani K, Bulo A *et al.* (2007). Spectrum of mutations in Albanian patients with haemophilia A: identification of ten novel mutations in the factor gene. *Haemophilia*, 13: 311-316.
- Celie PH, Van Stempvoort G, Jorieux S, Mazurier C, Van Mourik JA, Mertens K (1999). Substitution of Arg527 and Arg531 in factor VIII associated with mild haemophilia A: characterization in terms of subunit interaction and cofactor function. *Br J Haematol*, 106:792 – 800.
- Chen YC, Hu SH, Cheng SN, Chao TY (2010). Genetic analysis of haemophilia A in Taiwan. *Haemophilia*, 16: 1-7.
- Chi Ki Ngo J, Huang M, Roth D, Furie BC, Furie B (2008). Crystal structure of human factor VIII: implications for the formation of the Factor IXa-Factor VIIIa complex. *Structure*, 16: 597–606.
- Citron M, Godmilow L, Ganguly T, Ganguly A (2002). High throughput mutation screening of the factor VIII gene (F8C) in hemophilia A: 37 novel mutations and genotype-phenotype correlation. *Human Mutation*, 20:267-274.
- Collen D (1999). The plasminogen (fibrinolytic) system. *Thromb haemost*, 82:259-270.



- Conlan MG, Folsom AR, Finch A, Davis CE, Sorlie P, Marcucci G *et al.* (1993). Associations of factor VIII and von Willebrand factor with age, race, sex, and risk factors for atherosclerosis: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Thromb Haemost*, 70: 380–385.
- Curtis JE, Helgerson SL, Parker ET, Lollar P (1994). Isolation and characterization of thrombin-activated human factor VIII. *J Biol Chem*, 269:6246-6251.
- Cushman M, Yanez D, Psaty BM, Fried LP, Heiss G, Lee M *et al.* (1996). Association of fibrinogen and coagulation factors VII and VIII with cardiovascular risk factors in the elderly: the Cardiovascular Health Study Cardiovascular Health Study Investigators. *Am J Epidemiol*, 143:665–676.
- Dai L, Cutler A, Savidge GF, Mitchell J (2007). Characterization of a causative mutation of hemophilia A identified in the promoter region of the factor VIII gene (F8). *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 6: 193-215.
- David D, Ventura C, Moreira I, Diniz MJ, Antunes M, Tavares A *et al.* (2006). The spectrum of mutations and molecular pathogenesis of haemophilia A in 181 Portuguese patients. *Haematologica*, 91: 840-843
- Davie EW, Ratnoff OD (1964). Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*, 145: 1310-1312.
- de Lange M, Snieder H, Ariens RA, Spector TD, Grant PJ (2001). The genetics of haemostasis: a twin study. *Lancet*, 357:101–105.
- Djambas Khayat C, Salem N, Chouery E, Corbani S, Moix I, Nicolas E, *et al.* (2008). Molecular analysis of *F8* in Lebanese haemophilia A patients: novel mutations and phenotype-genotype correlation. *Haemophilia*, 14:709-716.
- D’Oiron R, Pipe SW, Jacqemin M (2008). Mild/moderate haemophilia A: new insights into molecular mechanisms and inhibitor development. *Haemophilia*, 14: 138–146.
- Dorner AJ, Bole DG, Kaufman RJ (1987). The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins. *J Cell Biol*, 105: 2665–2674.
- Duncan BK, Miller JH (1980). Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. *Nature*, 287:560–561.
- Eaton DL, Rodriguez H, Vehar GA (1986). Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry*, 25:505-512.

- Eaton DL, Vehar GA (1986). Factor VIII structure and proteolytic processing. *Prog Hemost Thromb*, 8:47–70.
- Eckhardt CL, Menke LA, van Ommen CH, van der Lee JH, Geskus RB, Kamphuisen PW *et al.* (2009). Intensive perioperative use of factor VIII and the Arg593→Cys mutation are risk factors for inhibitor development in mild/moderate hemophilia A. *J Thromb Haemost*, 7: 930–937.
- Ellgaard L, Helenius A (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4: 181–191.
- Fakharzadeh SS, Kazazian HH Jr (2000). Correlation between factor VIII genotype and inhibitor development in haemophilia A. *Semin Thromb Hemost*, 26:167-171.
- Fay PJ, Chavin SI, Schroeder D, Young FE, Marder VJ (1982). Purification and characterization of a highly purified human factor VIII consisting of a single type of polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79: 7200-7204.
- Fay PJ, Coumans J-V, Walker FJ (1991a). vonWillebrand factor mediates protection of factor VIII from activated protein C-catalysed inactivation. *J Biol Chem*, 266:2172-2177.
- Fay PJ, Haidaris PJ, Smudzin TM (1991b). Human factor VIIIa subunit structure. Reconstruction of factor VIIIa from the isolated A1/A3-C1-C2 dimer and A2 subunit. *J Biol Chem*, 266:8957-8962.
- Fay PJ, Haidaris PJ, Huggins CF (1993). Role of the COOH-terminal acidic region of A1 subunit in A2 subunit retention in human factor VIIIa. *J Biol Chem*, 268:17861-17866.
- Fay PJ, Beattie T, Huggins CF, Regan LM (1994). Factor VIIIa A2 subunit residues 558-565 represent a factor IXa interactive site. *J Biol Chem*, 269: 20522-20527.
- Fay PJ, Scandella D (1999). Human inhibitor antibodies specific for the factor VIII, A2 domain disrupt the interaction between the subunit and factor IXa. *J Biol Chem*, 274: 29826-29830.
- Federici AB (2003). The factor VIII/von Willebrand factor complex: basic and clinical issues. *Haematologica*, 88:3-12.
- Fernandez-Lopez O, Garcia-Lozano JR, Nunez-Vasquez R, Pérez-Garrido R, Núñez-Roldan A (2005). The spectrum of mutations in southern Spanish patients with haemophilia A and identification of 28 novel mutations. *Haematologica*, 90: 707-710.
- Figueiredo MS, Tavella MH, Simões BP (1994). Large DNA inversions, deletions and *TaqI* site mutations in severe haemophilia A. *Hum Genet*, 94: 473-478.
- Figueiredo MS, Brownlee GG (1995). Cis-acting elements and transcription factors involved in the promoter activity of the human factor VIII gene. *J Biol Chem*, 270: 1-11.

- Foster PA, Fulcher CA, Houghten RA, Zimmerman TS (1988). An immunogenic region within residues Val1670-Glu1684 of the factor VIII light chain induces antibodies which inhibit binding of factor VIII to von Willebrand factor. *J Biol Chem*, 263: 5230–5234.
- Foster PA, Fulcher CA, Houghten RA, Zimmerman TS (1990). Synthetic factor VIII peptides with amino acid sequences contained within the C2 domain of factor VIII inhibit factor VIII binding to phosphatidylserine. *Blood*, 75: 1999–2004.
- Fowler WE, Fay PJ, Arvan DS, Marder VJ (1990). Electron microscopy of human factor V and factor VIII: correlation of morphology with domain structure and localization of factor V activation fragments. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 7648–7652.
- Franchini M, Montagnana M, Targer G, Veneri D, Zaffanello M, Salvagno GL *et al.* (2009). Inter-patient phenotypic inconsistency in severe congenital hemophilia: a systematic review of the role of inherited thrombophilia. *Sem Thromb Hemost*, 35:307-312.
- Furie B, Furie BC (1988). The molecular basis of blood coagulation. *Cell*, 5:505-518.
- Gailani D (2000). Activation of factor IX by Factor XIa. *Trends Cardiovasc Med*, 10:198-204.
- Gale AJ, Cramer TJ, Rozenshteyn D, Cruz JR (2008). Detailed mechanisms of the inactivation of factor VIIIa by activated protein C in the presence of its cofactors, protein S and factor V. *J Biol Chem*, 283: 16355–16362.
- Ghosh K, Jijina F, Pathare AV, Mohanty D (1999). Gas gangrene in a patient with severe haemophilia A. *Haemophilia*, 5: 301–305.
- Ghosh K, Shetty S, Kulkarni B, Nair S, Pawar A, Khare A, Baindur S, Mohanty D (2001). Development of inhibitors in patients with haemophilia from India. *Haemophilia*, 7: 273–278.
- Gilbert MS (1981). Haemophilic arthropathy: an overview. In: Selingsohn U, Rimon A, Horoszowski H (eds). *Haemophilia*. 2 ed. Alan R. Liss, New York, pp. 157-162.
- Gitscheir J, Wood WI, Goralka TM (1984). Characterization of the human factor VIII gene. *Nature*, 312:326-330.
- Goodeve AC (2010). Another step towards understanding hemophilia A molecular pathogenesis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 8: 2693–2695.
- Goudemand J (1999). Hemophilia treatment of patients with inhibitors: cost issues. *Haemophilia*, 5:397-401.
- Gouw SC, Van der Bom JG, Van der Berg HM, Zewald RA, Ploos Van Amstel JK, Mauser-Bunschoten EP (2010). Influence of the type of F8 gene mutation on inhibitor development in a single centre cohort of severe haemophilia A patients. *Haemophilia*, 17: 275-281.

- Graw J, Brackmann H-H, Oldenburg J, Schneppenheim R, Spannagl M, Schwaab R (2005). Haemophilia A: From mutation analysis to new therapies. *Nature Reviews*, 6:488-501.
- Green PM, Bagnall RD, Waseem NH, Gianelli F (2008). Haemophilia A mutations in the UK: results of screening one-third of the population. *Brit J Haematol*, 143: 115-128.
- Guillet B, Lambert T, d'Oiran R, Proulle V, Plantier JL, Rafowics A *et al.* (2006). Detection of 95 novel mutations in coagulation Factor VIII gene F8 responsible for haemophilia A: results from a single institution. *Hum Mut*, 27: 676-685.
- HAMSTERS - The Haemophilia A Mutation, Structure, Test And Resource Site. <http://Europium.Csc.Mrc.Ac.Uk/Webpages/Main/Main.htm>. Acesso em dezembro de 2012.
- Hay CR, Ollier W, Pepper L, Cumming A, Keeney S, Goodeve AC *et al.* (1997). HLA class II profile: a weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe hemophilia A. A UKHCDO Inhibitor Working Party. *Thromb Haemost*, 77: 234–237.
- Hay CRM (1998). Factor VIII inhibitors in mild and moderate-severity haemophilia A. *Haemophilia*, 4: 558–563.
- Healey JF, Barrow RT, Tamim HM, Lubin IM, Shima M, Scandella D *et al.* (1998). Residues Glu2181–Val2243 contain a major determinant of the inhibitory epitope in the C2 domain of human factor VIII. *Blood*, 92:3701–3709.
- Herz J, Clouthier DE, Hammer RE (1992). LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell*, 71: 411–421.
- Hill M, Deam S, Gordon B, Dolan G (2005). Mutation analysis in 51 patients with haemophilia A: report of 10 novel mutations and correlations between genotype and clinical phenotype. *Haemophilia*, 11: 133-141.
- Hoffbrand JA, Pettit JE, Moss PAH (2001). *Essential haematology*. 4th edition. Blackwell Science.
- Hoffman M, Monroe DM (2001). A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*, 85:958-965.
- Hoffman M (2003). Remodeling the blood coagulation cascade. *J Thromb Thrombolysis*, 16:17-20.
- Hortin G, Folz R, Gordon JJ, Strauss AW (1986). Characterization of sites of tyrosine sulfation in proteins and criteria for predicting their occurrence. *Biochem Biophys Res Commun*, 141:326-333.

- Hoyer LW (1995). The incidence of factor VIII inhibitors in patients with severe haemophilia A. In: Aledort LM, Hoyer LW, Lusher JM, Reisner HM, White GC (eds) *Inhibitors to coagulation factors*. Plenum, Chapel Hill, pp 35-46.
- Hua BL, Yan Z, Liang Y, Yan M, Fan LK, Li KX *et al.* (2010). Identification of seven novel mutations in the factor VIII gene in 18 unrelated Chinese patients with haemophilia A. *Chin Med J*, 123: 305-310.
- Huntington JA (2005). Molecular recognition mechanisms of thrombin. *J Thromb Haemost*, 3:1861-1872.
- Huttner WB (1988). Tyrosine sulfation and the secretory pathway. *Annu Rev Physiol*, 50:363-376.
- Hwang SH, Kim MJ, Lim JA, Kim HC, Kim HS (2009). Profiling of Factor VIII mutations in Korean haemophilia A. *Haemophilia*, 15: 1311-1317.
- Ivaskevicius V, Jurgutis R, Rost S, Müller A, Schmitt C, Wulff K, *et al.* (2001). Lithuanian haemophilia A and B registry comprising phenotypic and genotypic data. *Brit J Haematol*, 112:1062-1070.
- Jacquemin MG, Saint-Remy JM (1998). Factor VIII immunogenicity. *Haemophilia*, 4:552-557.
- Jacquemin MG, Lavend'homme R, Benhida A, Vanzieleghem B, D'Oiron R, Lavergne JM *et al.* (2000). 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*, 96: 958-965.
- Jayandharan G, Shaji RV, Baidya S, Nair SC, Chandy M, Srivastava A (2005). Identification of factor VIII gene mutations in 101 patients with haemophilia A: mutation analysis by inversion screening and multiplex PCR and CSGE and molecular modelling of 10 novel missense substitutions. *Haemophilia*, 11: 481-491.
- Jeremic M, Weisert O, Gedde-Dahl TW (1976). Factor VIII (AHG) levels in 1016 regular blood donors: the effects of age, sex, and ABO blood groups. *Scand J Clin Lab Invest*, 36:461-466.
- Kamphuisen PW, Houwing-Duistermaat JJ, van Houwelingen HC, Eikenboom JC, Bertina RM, Rosendaal FR (1998). Familial clustering of factor VIII and von Willebrand factor levels. *Thromb Haemost*, 79:323-327.
- Kane WH, Davie EW (1988). Blood coagulation factors V and VIII: structural and functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders. *Blood*, 71: 539-555.

- Kazazian HH Jr, Tuddenham EGD, Antonarakis SE (1995). Hemophilia A parahemophilia: deficiencies of coagulation factors VIII and V. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. Seventh Edition. NY: McGraw Hill, Chapter 106, 3241-67.
- Kempton CL, White GC (2009). How we treat a hemophilia A patient with a factor VIII inhibitor. *Blood*, 113: 11-17.
- Koedam JA, Meijers JC, Sixma JJ, Bouma BN (1988). Inactivation of human factor VIII by activated protein C: Cofactor activity of protein S and protective effect of vonWillebrand factor. *J Clin Invest*, 82:1236-1243.
- Koedam JA, Hamer RJ, Beeser-Visser NH, Bouma BN, Sixma JJ (1990). The effect of von Willebrand factor on activation of factor VIII by factor Xa. *Eur J Biochem*, 189:229-234.
- Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE, Gitschier J (1993). Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nature Genet*, 5:236-241.
- Laloz MR, McVey JH, Pattinson JK, Tuddenham EG (1991). Haemophilia A diagnosis by analysis of a hypervariable dinucleotide repeat within the factor VIII gene. *Lancet*, 338:207-11.
- Laloz MRA, McVey JH, Michaelides K (1992). Haemophilia A diagnosis by analysis of a novel dinucleotide tandem repeat sequence within the factor VIII gene. *Br J Haematol*, 80:3a.
- Lannoy N, Abinet I, Bosmans A, Lambert C, Vermeylen C, Hermans C (2012). Computational and molecular approaches for predicting unreported causal missense mutations in Belgian patients with haemophilia A. *Haemophilia*, 18:331-339.
- Lapan KA, Fay PJ (1997). Localization of a factor X interactive site in the A1 subunit of factor VIIIa. *J Biol Chem*, 272: 2082-2088.
- Larsson SA (1984). Hemophilia in Sweden. Studies on demography of hemophilia and surgery in hemophilia and von Willebrand disease. *Acta Med Scand Suppl*, 684: 1-72.
- Laurie AD, Sheen CR, Hanrahan V, Smith MP, George PM (2007). The molecular aetiology of haemophilia A in a New Zealand patient group. *Haemophilia*, 13: 420-427.
- Lavigne-Lissalde G, Rothschild C, Pouplard C, Lapalud P, Gruel Y, Schved JF *et al.* (2009). Characteristics, Mechanisms of Action, and Epitope Mapping of Anti-factor VIII Antibodies. *Allerg Immunol*, 37:67-79.
- Leiria LB, Roisenberg I, Salzano FM, Bandinelli E (2009). Introns 1 and 22 inversions and factor VIII inhibitors in patients with severe haemophilia A in southern Brazil. *Haemophilia*, 15:309-313.

- Lenting PJ, Donath MJ, van Mourik JA, Mertens K (1994). Identification of a binding site for blood coagulation factor IXa on the light chain of human factor VIII. *J Biol Chem*, 269:7150-7155.
- Lenting PJ, van den loo JW, Donath MJ, van Mourik JA, Mertens K (1996). The sequence Glu1811—Lys1818 of human blood coagulation factor VIII comprises a binding site for activated factor IX. *J Biol Chem*, 271:1935–1940.
- Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K (1998). The Life Cycle of Coagulation Factor VIII in View of Its Structure and Function. *The Journal of The American Society of Hematology*, 92: 3983-3996.
- Lenting PJ, Neels JG, van den Berg BMM, Clijsters PPFM, Meijerman DWE, Pannekoek H *et al.* (1999). The light chain of factor VIII comprises a binding site for low-density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem*, 274: 23734–23739.
- Leyte A, Verbeet MP, Brodniewicz-Proba T, van Mourik JA, Mertens K (1989). The interaction between human blood coagulation factor VIII and vonWillebrand factor. *Biochem J*, 257:679-683.
- Lillicrap D, Vandendriessche T, High K (2006). Cellular and genetic therapies for haemophilia. *Haemophilia*, 12:36-41.
- Liu ML, Shen BW, Nakaya S, Pratt KP, Fujikawa K, Davie EW *et al.* (2000). Hemophilic factor VIII C1- and C2-domain missense mutations and their modeling to the 1.5-angstrom human C2-domain crystal structure. *Blood*, 96: 979–87.
- Lollar P, Knutson GJ, Fass DN (1985). Activation of porcine factor VIII:C by thrombin and factor Xa. *Biochemistry*, 24: 8056–8064.
- Lollar P, Hill-Eubanks DC, Parker CG (1988). Association of the factor VIII light chain with von Willebrand factor. *J Biol Chem*, 263:10451-10455.
- Lowe GD, Rumley A, Woodward M, Morrison CE, Philippou H, Lane DA *et al.* (1997). Epidemiology of coagulation factors, inhibitors and activation markers: the Third Glasgow MONICA Survey, I: illustrative reference ranges by age, sex and hormone use. *Br J Haematol*, 97:775–784.
- Lusher JM, Arkin S, Abildgaard CF, Schwartz RS (1993). Recombinant factor VIII for the treatment of previously untreated patients with haemophilia A – safety, efficacy and development of inhibitors. *N Eng J Med*, 328:453-459.
- Ma C-G, Chang S-P, Chen M, Kuo S-J, Chang C-S, Shen M-C. (2008). The spectrum of the *Factor 8* (F8) defects in Taiwanese patients with haemophilia A. *Haemophilia*, 14: 787-795.

- Macfarlane RG (1964). An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature*, 202: 498-499.
- Mann KG, Nesheim ME, Church WR, Haley P, Krishnaswamy S (1990). Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood*, 76:1-16.
- Mannucci PM (2000). Desmopressin (DDAVP) in the treatment of bleeding disorders: the first twenty years. *Haemophilia*, 6: 60–67.
- Mannucci PM (2002). Hemophilia and related bleeding disorders: a story of dismay and success. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2002: 1-9.
- Mannucci PM (2003). Hemophilia: treatment options in the twenty-first century. *J Thromb Haemost*, 1:1349-1355.
- Mannucci PM (2008). Back to the future: a recent history of haemophilia treatment. *Haemophilia*, 14: 10-18.
- Marcus AJ, Safier LB (1993). Thromboregulation multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *Faseb Journal*, 7:516-522.
- Margaglione M, Castaman G, Morfini M, Rocino A, Santagostino E, Tagariello G *et al.* (2008). The Italian AICE-Genetics hemophilia A database: results and correlation with clinical phenotype. *Haematologica*, 93: 722-728.
- Mazurier C, Dieval J, Jorieux S, Delobel J, Goudemand M (1990). 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*, 75: 20–26.
- McMillan CW, Shapiro SS, Whitehurst D, Hoyer LW, Rao AV, Lazerson J (1988). The natural history of factor VIII:C inhibitors in patients with hemophilia A: a national cooperative study. II. Observations on the initial development of factor VIII:C inhibitors. *Blood*, 71: 344–348.
- Mertens K, Celie PH, Kolkman JA, Lenting PJ (1999). Factor VIII–factor IX interactions:molecular sites involved in enzyme–cofactor complex assembly. *Thromb Haemost*, 82:209–217.
- Michnick DA, Pittman DD, Wise RJ, Kaufman RJ (1994). Identification of individual tyrosine sulfation sites within factor VIII required for optimal activity and efficient thrombin cleavage. *J Biol Chem*, 269: 20095–20102.
- Murru S, Casula L, Pecorara M, Mori P, Cao A, Pirastu M (1990). Illegitimate recombination produced a duplication within the FVIII gene in a patient with mild hemophilia A. *Genomics*, 7: 115–118.



- Nair PS, Shetty S, Kulkarni B, Ghosh K. (2010). Molecular pathology of haemophilia A in Indian patients: identification of 11 novel mutations. *Clin Chim Acta*, 411:2004-2008.
- Nakamura M, Shishido N, Nunomura A, Smith MA, Perry G, Hayashi Y, *et al* (2007). Three histidine residues of amyloid-beta peptide control the redox activity of copper and iron. *Biochemistry*, 46:12737-12743.
- Narita M, Rudolph AE, Miletich JP, Schwartz AL (1998). The low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) mediates clearance of coagulation factor Xa in vivo. *Blood*, 91: 555–560.
- Neels JG, van den Berg BM, Mertens K, Pannekoek H, Zonneveld A-J, Lenting P (2000). Activation of factor IX zymogen results in exposure of a binding site for low-density lipoprotein receptor-related protein. *Blood*, 96: 3459–3465.
- Nesbitt IM, Goodeve AC, Guilliatt AM, Makris M, Preston FE, Peake IR (1996). Characterisation of type 2N von Willebrand disease using phenotypic and molecular techniques. *Thromb Haemost*, 75: 959–964.
- Newell JL, Fay PJ (1995). Proteolysis at Arg740 facilitates subsequent bond cleavages during thrombin-catalyzed activation of factor VIII. *J Biol Chem*, 282: 25367–25375.
- Nogami K, Shima M, Hosokawa K, Suzuki T, Koide T, Saenko EL, *et al.* (1999). Role of factor VIII C2 domain in factor VIII binding to factor Xa. *J Biol Chem*, 274:31000-31007.
- O'Brien LM, Medved LV, Fay PJ (1995). Localization of factor IXa and factor VIIIa interactive sites. *J Biol Chem*, 270:27087-27092.
- Oldenburg J, Picard JK, Schwaab R, Brackmann HH, Tuddenham EG, Simpson E (1997). HLA genotype of patients with severe haemophilia A due to intron 22 inversion with and without inhibitors to factor VIII. *Thromb Haemost*, 77: 238–42.
- Oldenburg J, El-Maarri O, Schwaab R (2002). Inhibitor development in correlation to factor VIII genotypes. *Haemophilia*, 8: 23–29.
- Oldenburg J, Pavlova A (2006). Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia*, 12: 15-22.
- Oldenburg J, Dolan G, Lemm G (2009). Haemophilia care then, now and the future. *Haemophilia*, 15: 2–7.
- Oldenburg J, Pavlova A (2010). Discrepancy between one-stage and chromogenic factor VIII activity assay results can lead to misdiagnosis of haemophilia A phenotype. *Hämostaseologie*, 30: 207–211.

- Ozello MC, Villaça PR, Almeida JOS, Bueno TMF, Miranda PAP, Hart WM *et al.* (2007). A cost evaluation of treatment alternative for mild-to-moderate bleeding episodes in patients with haemophilia and inhibitors in Brazil. *Haemophilia*, 13: 462-469.
- Pan Y, DeFay T, Gitschier J, and Cohen FE (1995). Proposed structure of the A domains of factor VIII by homology modelling. *Nat Struct Biol*, 2: 740-744.
- Pellequer JL, Gale AJ, Griffin JH, and Getzoff ED (1998). Homology models of the C domains of blood coagulation factors V and VIII: a proposed membrane binding mode for FV and FVIII C2 domains. *Blood Cells Mol Dis*, 24: 448-461.
- Pemberton S, Lindley P, Zaitsev V, Card G, Tuddenham EG, Kemball-Cook G (1997). A molecular model for the triplicated A domains of human factor VIII based on the crystal structure of human ceruloplasmin. *Blood*, 89: 2413-2421.
- Peyvandi F, Jayandharan G, Chandy MA, Srivastava A, Nakaya SM, Johnson MJ *et al.* (2006). Genetic diagnosis of haemophilia and other inherited bleeding disorders. *Haemophilia*, 12:82-89.
- Pipe SW, Saenko EL, Eickhorst AN, Kemball-Cook G, Kaufman RJ (2001). Hemophilia A mutations associated with 1-stage/2-stage activity discrepancy disrupt protein-protein interactions within the triplicated A domains of thrombin- activated factor VIIIa. *Blood*, 97: 685-691.
- Pitmann DD, Kaufman RJ (1988). Proteolytic requirements for thrombin activation of antihemophilic factor VIII. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 2429-2433.
- Pittman DD, Wang JH, Kaufman RJ (1992). Identification and functional importance of tyrosine sulfate residues within recombinant factor VIII. *Biochemistry*, 31:3315-3325.
- Pittman DD, Alderman EM, Tomkinson KN, Wang JH, Giles AR, Kaufman RJ (1993). Biochemical, immunological and in vivo functional characterization of B-domain-deleted factor VIII. *Blood*, 81:2925- 2935.
- Poulsen AL, Pedersen LH, Hvas AM, Poulsen LH, Thykjaer H, Ingerslev J (2009). Assay discrepancy in mild haemophilia A: entire population study in a National Haemophilia Centre. *Haemophilia*, 15: 285-289.
- Pratt KP, Shen BW, Takeshima K, Davie EW, Fujikawa K, Stoddard BL (1999). Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution. *Nature*, 402:439- 442.
- Ramgren O (1962). Haemophilia in Sweden. V. Medico-social aspects. *Acta Med Scand Suppl*, 379: 37-60.

- Ravanbod S, Rassoulzadegan M, Rastegar-Lari G, Jazebi M, Enayat S, Ala F (2012). Identification of 123 previously unreported mutations in the *F8* gene of Iranian patients with haemophilia A. *Haemophilia*, 18:340-346.
- Regan LM, O'Brien LM, Beattie TL, Sudhakar K, Walker FJ, Fay PJ (1996). Activated protein C-catalyzed proteolysis of factor VIIIa alters its interactions within factor Xase. *J Biol Chem*, 271: 3982–3987.
- Repešé Y, Slaoni M, Fernandez D, Crautier P, Costa C, Costa JM *et al.* (2007). Factor VIII (FVIII) gene mutations in 120 patients with haemophilia A: detection of 26 novel mutations and correlation with FVIII inhibitor development. *J Thromb Haemost*, 5: 1469-1476.
- Rezende SM, Pinheiro K, Caram C, Genovez G, Barca D (2009). Registry of inherited coagulopathies in Brazil: first report. *Haemophilia*, 15: 142–149.
- Riccardi F, Rivolta GF, Franchini M, Pattacini C, Neri TM, Tagliaferri A (2009). Characterization of a novel mutation in the F8 promoter region associated with mild hemophilia A and resistance to DDAVP therapy. *J Thromb Haemost*, 7: 1234-1235.
- Riccardi F, Tagliaferri A, Martorana D, Rivolta GF, Valdre L, Rodrigo G *et al.* (2010). Spectrum of F8 gene mutations in haemophilia A patients from a region of Italy: identification of 23 new mutations. *Haemophilia*, 16: 791–800.
- Rieger A (1996). Aspectos genéticos e epidemiológicos dos inibidores na hemofilia A. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Rieger A, Roisenberg I (1999). Prevalence of factor VIII inhibitors in patients with hemophilia A in Brazil. *Thromb Haemost*, 81:475-476.
- Rizza CR, Spooner RJ (1983). Treatment of haemophilia and related disorders in Britain and Northern Ireland during 1976–80: report on behalf of the directors of haemophilia centres in the United Kingdom. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 286: 929–933.
- Roberts HR, Monroe DM, Escobar MA (2004). Current concepts of hemostasis. *Anesthesiology*, 100:722-730.
- Roelse JC, de Laaf RTM, Mertens K (1999). Altered sensitivity towards factor IXa explains assay discrepancies in plasma of hemophilia A patients with a GLU720LYS substitution in factor VIII. *Thromb Haemost*, 82:5a.
- Rosen S (1984). Assay of factor VIII:C with a chromogenic substrate. *Scand J Haematol Suppl*, 40: 139–145.

- Rossetti LC, Goodeve A, Larripa IB, De Brasi CD (2004). Homeologous recombination between aluSx-sequences as a cause of haemophilia. *Hum Mutat*, 24:440-445.
- Rossetti LC, Radic CP, Candela M, Bianco RP, Pinto MT, Godeve A *et al.* (2007). Sixteen novel haemophilia A causative mutations in the first Argentinian series of severe molecular defect. *Haematologica*, 92: 842-845.
- Saenko EL, Shima M, Rajalakshmi KJ, Scandella D (1994). A role for the C2 domain of factor VIII in binding to von Willebrand factor. *JBiol Chem*, 269:11601–1160.
- Saenko EL, Scandella D (1997). The acidic region of the factor VIII light chain and the C2 domain together form the high affinity binding site for von Willebrand factor. *J Biol Chem*, 272:18007– 18014.
- Saenko EL, Yakhyaev AV, Mikhailenko I, Strickland DK, Sarafanov AG (1999). Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. *J Biol Chem*, 274: 37685–37692.
- Salviato R, Belvini D, Radossi P, Sartori R, Pierobon F, Zanotto D *et al.* (2007). F8 gene mutations profile and ITT response in a cohort of Italian haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia*, 13:361-372.
- Samaiya A, Gupta S, Chumber S, Kashyap R, Dewanda NK, Vashist S *et al.* (2001). Blunt abdominal trauma with delayed rupture of splenic haematoma in a haemophiliac patient. *Haemophilia*, 7:331–334.
- Sandberg H, Almstedt A, Brandt J, Gray E, Holmquist L, Oswaldsson U, *et al.* (2001). Structural and functional characteristics of the B-domain-deleted recombinant factor VIII protein, r-VIII SQ. *Thromb Haemost*, 85:93-100.
- Sanna V, Zarrilli F, Nardiello P, D'Argenio V, Rocino A, Coppola A, *et al.* (2008). Mutational spectrum of *F8* gene and prothrombotic gene variants in haemophilia A patients from Southern Italy. *Haemophilia*, 14:796-803.
- Santacroce R, Santaro R, Sessa F, Iannaccaro P, Sarno M, Largo V *et al.* (2008). Screening of mutations of haemophilia A in 40 Italian patients: a novel G-to-A mutation in intron 10 of the *F8* gene as a putative cause of mild haemophilia in southern Italy. *Blood Coagul Fibrinol*, 19: 197-202.
- Sarafanov AG, Ananyeva NM, Shima M, Saenko EL (2001). Cell surface heparan sulfate proteoglycans participate in factor VIII catabolism mediated by low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem*, 276:11970-11979.

- Scandella D, Marttingly M, Prescott R (1993). A recombinant factor VIII domain polypeptide quantitatively neutralizes human inhibitor antibodies that bind to A2. *Blood*, 82:1767-1775.
- Schlit AF, Grandjean P, Donnez J, Lavenne E (1995). Large increase in plasmatic 11-dehydro-TxB2 levels due to oral contraceptives. *Contraception*, 51:53–58.
- Schwaab R, Brackmann HH, Meyer C, Seehafer J, Kirchgesser M, Haack A *et al.* (1995). Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. *Thromb Haemost*, 74: 1402–1406.
- Selvaraj SR, Scheller AN, Miao HZ, Kaufman RJ, Pipe SW (2012). Bioengineering of coagulation factor VIII for efficient expression through elimination of a dispensable disulfide loop. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 10: 107–115.
- Severs JC, Carnine M, Eguizabal H, Mock KK (1999). Characterization of tyrosine sulfate residues in antihemophilic recombinant factor VIII by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry and amino acid analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 13:1016-1023.
- Sharathkumar A, Lillicrap D, Blanchette VS, Kern M, Leggo J, Stain AM, *et al.* (2003). Intensive exposure to factor VIII is a risk factor for inhibitor development in mild hemophilia A. *J Thromb Haemost*, 1: 1228–1236.
- Shen BW, Spiegel PC, Chang CH, Huh JW, Lee JS, Kim J, *et al.* (2008). The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. *Blood*, 111:1240–1247.
- Shetty S, Vora S, Kulkarni B, Mota L, Vijapurkar M, Quadros L, *et al.* (2007). Contribution of natural anticoagulant and fibrinolytic factors in modulating the clinical severity of hemophilia patients. *Br J Haematol*, 138: 541-544.
- Silva Pinto C, Fidalgo T, Salvado R, Marques D, Gonçalves E, Martinho P, *et al.* (2012). Molecular diagnosis of haemophilia A at Centro Hospitalar de Coimbra in Portugal: study of 103 families – 15 new mutations. *Haemophilia*, 18:129-138.
- Stassen JM, Arnout J, Deckmyn H (2004). The hemostatic system. *Curr Med Chem*, 11: 2245-2260.
- Stonebraker JS, Bolton-Maggs PHB, Michael Soucie J, Walker I, Brooker M (2010). A study of variations in the reported haemophilia A prevalence around the world. *Haemophilia*, 16: 20–32.
- Strickland DK, Kounnas MZ, Argraves WS (1995). LDL receptor-related protein: a multiligand receptor for lipoprotein and proteinase catabolism. *FASEB J.*, 9: 890–898.

- Sultan Y (1992). Prevalence of inhibitors in a population of 3435 hemophilia patients in France. French Hemophilia Study Group. *Thromb Haemost*, 67: 600–602.
- Timur AA, Gürgey A, Aktuglu G, Kavakli K, Canatan D, Olek K *et al.* (2001). Molecular pathology of haemophilia A in Turkish patients: identification of 36 independent mutations. *Haemophilia*, 7: 475-481.
- Toole JJ, Pittman DD, Orr EC, Murtha P, Wasley LC, Kaufman RJ (1986). A large region (approximately equal to 95 kDa) of human factor VIII is dispensable for in vitro procoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 5939–5942.
- Tracy RP, Bovill EG, Fried LP, Heiss G, Lee MH, Polak JF *et al.* (1992). The distribution of coagulation factors VII and VIII and fibrinogen in adults over 65 years: results from the Cardiovascular Health Study. *Ann Epidemiol*, 2:509–519.
- Tuddenham EGD, Cooper DN (1994). Factor VIII and haemophilia A. *Oxford Mon Med Genet*, 25:19-76.
- Tuddenham EGD, Mcvey JH (1998). The genetic basis of inhibitor development in haemophilia A. *Haemophilia*, 4:543-545.
- Vehar GA, Key B, Eaton D, Rodriguez H, O'Brien DP, Rotblat F, *et al.* (1984). Structure of human factor VIII. *Nature*, 312:337-342.
- Venceslá A, Corral-Rodriguez MA, Baena M, Cornet M, Domenech M, Baiget M *et al.* (2008). Identification of 31 novel mutations in the F8 in Spanish haemophilia A patients: structural analysis of 20 missense mutations suggests new intermolecular binding sites. *Blood*, 111: 3468-3478.
- Venkateswarlu D (2010). Structural investigation of zymogenic and activated forms of human blood coagulation factor VIII: a computational molecular dynamics study. *BMC Structural Biology*, 10:7.
- Vinciguerra C, Zawadzki C, Dargaud Y, Pernod G, Berger C, Nougier C *et al.* (2006). Characterization of 96 mutations in 128 unrelated severe haemophilia A patients from France. *Thromb Haemost*, 95: 593-598.
- Vlot AJ, Koppelman SJ, van den Berg MH, Bouma BN, Sixma JJ (1995). The affinity and stoichiometry of binding of human factor VIII to vonWillebrand factor. *Blood*, 85:3150-3157.
- Wakabayashi H, Koszelak ME, Mastro M, Fay PJ (2001). Metal ion-independent association of factor VIII subunits and the roles of calcium and copper ions for cofactor activity and inter-subunit affinity. *Biochemistry*, 40:10293-10300.

- Wakabayashi H, Freas J, Zhou Q, Fay PJ (2004). Residues 110-126 in the A1 domain of factor VIII contain a Ca<sup>2+</sup> binding site required for cofactor activity. *J Biol Chem*, 279:12677-12684.
- White B, Cotter M, Byrne M, O'Shea E, Smith OP (2000). High responding factor VIII inhibitors in mild haemophilia – is there a link with recent changes in clinical practice? *Haemophilia*, 6: 113–115.
- White GC II, Rosendaal F, Aledort LM, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C *et al.* (2001). Factor VIII and Factor IX Subcommittee. Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost*, 85:560.
- Wight J, Paisley S (2003). The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. *Haemophilia*, 9: 418–435.
- Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D (1989). Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 2839-2843.
- Wion KL, Kelly D, Summerfield JA, Teddenham EGD, Lawn RM (1985). Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature*, 317: 716-729.
- Xue F, Zhang L, Sui T, Ge J, Gu D, Du W, *et al.* (2010). Factor VIII gene mutations profile in 148 Chinese hemophilia A subjects. *Europ J Haematol*, 85:264-272.
- You C-W, Son H-S, Kim HJ, Woo E-J, Kim S-A, Baik H-W (2010). Mutation analysis of Factor VIII in Korean patients with severe hemophilia A. *Internat J Hematol*, 91:784-791.
- Zaitseva I, Zaitsev V, Card G, Moshkov K, Bax B, Ralph A, Lindley P (1996). The X-ray structure of human serum caeruloplasmin at 3.1 Å : nature of the copper centre. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 1: 15–23.
- Zhang HA, Skupsky J, Scott WD (2009). Factor VIII inhibitors: risk factors and methods for prevention and immune modulation. *Allerg Immunol*, 37:114-124.

## **Anexos**

Artigos publicados durante o período de Mestrado relacionados com o tema da Dissertação.

- 1. Immune system polymorphisms and factor VIII inhibitor formation in Brazilian haemophilia A severe patients**
- 2. Genetic changes in severe haemophilia A: new contribution to the aetiology of a complex disease**



**Anexo 1. Immune system polymorphisms and factor VIII inhibitor formation in Brazilian haemophilia A severe patients**

**Anexo 2. Genetic changes in severe haemophilia A: new contribution to the aetiology of a complex disease**