

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

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS MUTAÇÕES EM PACIENTES  
COM HEMOFILIA B**

**ANDERSON GUIMARÃES PANTOJA**

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

**Orientador: Francisco M. Salzano**

**Co-orientadora: Eliane Bandinelli**

Porto Alegre, abril de 2014.

**Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.**

**Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hemostasia do Departamento de Genética da Universidade do Rio Grande do Sul. As fontes financiadoras desse estudo foram o Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e o Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX).**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Mauro Salzano, pela oportunidade, orientação, pelo convívio e, sobretudo, por ter acreditado em mim.

À minha co-orientadora, Eliane Bandinelli, pelo apoio, disponibilidade, conhecimento e amizade.

Às minhas queridas colegas do Laboratório de Hemostasia, Ana Paula Ornaghi, Maria Rodrigues Botton e Patrícia Viola, que são pessoas muito especiais que tive o privilégio de conhecer e conviver ao longo desse projeto. Agradeço todos os momentos e alegrias vividos, em especial a Mariana Rost Meirelles que me ajudou muito na elaboração deste estudo, sempre solícita e responsável. Sem o apoio incondicional dessas pessoas especiais este projeto não seria possível.

À minha esposa, Aline Eickhoff, que dividiu comigo os bons e maus momentos desta trajetória, por todo apoio e carinho.

Aos meus pais, pela educação e por me ensinarem a nunca desistir.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro na realização deste estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Aos integrantes da banca examinadora pela análise deste estudo.

A todos que contribuíram para a realização deste estudo e que confiaram no meu potencial, meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

RESUMO	08
ABSTRACT	09
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	10
1. Hemostasia	10
1.1. A Via Clássica da Coagulação Sanguínea	11
1.2. O Modelo Celular da Coagulação	14
1.3. As Hemofilias	16
1.3.1. A Hemofilia B	16
1.3.2. Classificação, Sintomatologia e Diagnóstico da Hemofilia B	18
1.3.3. O Fator IX (FIX)	19
1.3.4. O Gene e a Estrutura do FIX	20
1.3.5. Mutações no Gene do FIX e a Hemofilia B	23
1.3.6. Estudos Específicos sobre a Investigação Molecular de Mutações no Gene do FIX	23
CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS	25
CAPÍTULO 3 - PACIENTES E MÉTODOS	26
3.1. Coleta de Amostras	26
3.2. Ensaio de Coagulação e Extração do Material genético	27
3.3. Detecção de Mutações e Sequenciamento do DNA	27
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. Discussão	36
4.2. Perspectivas	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

FII: Fator II da coagulação

FV: Fator V da coagulação

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

FXI: Fator XI da coagulação

FXII: Fator XII da coagulação

FT: Fator tissular

FvW: Fator de Von Willebrand

HA: Hemofilia do tipo A

HB: Hemofilia do tipo B

IRFT: Inibidor da rota do fator tissular

TP: tempo de protrombina

TTPA: tempo de tromboplastina parcial ativada

TT: tempo de trombina

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquema geral da formação da rede de fibrina..	13
<b>Figura 2:</b> Modelo celular de coagulação.....	15
<b>Figura 3:</b> Localização do gene do FIX.....	20
<b>Figura 4:</b> Gene, RNA mensageiro, proteína precursora e proteína madura do FIX.	21
<b>Figura 5:</b> Ilustração do complexo ternário de FT / FVIIa com FIX .....	22
<b>Figura 6:</b> A estratégia utilizada para a detecção de mutações .....	29
<b>Figura 7:</b> Fluxograma para a detecção de mutações na hemofilia B.....	30

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Número de hemofílicos nos países de maior ocorrência de casos.....	17
<b>Tabela 2.</b> Prevalência das coagulopatias hereditárias e demais transtornos hemorrágicos por diagnóstico, Brasil, 2011-2012.....	17
<b>Tabela 3.</b> Diferentes tipos de hemofilia B, sintomas, atividade do fator IX e frequência em nível mundial.....	19
<b>Tabela 4.</b> Lista das mutações detectadas em pacientes brasileiros que não foram formalmente descritas em artigos científicos (Rallapalli <i>et.al.</i> ,2013).....	24
<b>Tabela 5.</b> Sequências de oligonucleotídeos para a amplificação do gene do fator IX com as regiões flanqueadoras .....	28
<b>Tabela 6.</b> Número de pacientes estudados em cada grau da hemofilia B .....	32
<b>Tabela 7.</b> Resumo das mutações encontradas.....	33
<b>Tabela 8.</b> Relação das mutações encontradas ao longo dos éxons nas 25 famílias e sua atividade do fator IX.....	34
<b>Tabela 9.</b> Análise estatística comparativa de três diferentes aspectos do presente estudo com o total conhecido até o momento.....	36
<b>Tabela 10.</b> Recorrência das mutações de sentido trocado identificadas no presente estudo, como indicado no banco de dados <a href="http://www.factorix.org/">http://www.factorix.org/</a> e sua associação com as formas clínicas da hemofilia B.....	38

## RESUMO

A Hemofilia B (HB) é uma doença hemorrágica causada pela redução ou ausência da atividade do Fator IX da coagulação (FIX), devido a mutações no gene que codifica a proteína. O padrão de herança é recessivo ligado ao sexo. O FIX ativado, em complexo com o fator VIII (FVIII) ativado, forma o complexo Xase intrínseco, o qual leva à ativação do fator X (FX). O FX ativado transforma a protrombina em trombina, a qual converte fibrinogênio em fibrina, formando o coágulo sanguíneo. O gene do FIX localiza-se no cromossomo Xq27.1, ele compreende 33kb e está organizado em 8 éxons (a-h). Existem 1.094 mutações descritas que resultam em hemofilia B nas formas grave, moderada ou leve, sendo que mais da metade dessas mutações estão associadas à forma grave da hemofilia B. O presente estudo tem por objetivo geral a caracterização molecular das mutações em pacientes diagnosticados com hemofilia B residentes no Rio Grande do Sul. Esse estudo das mutações possibilita uma melhor compreensão da genética molecular da doença na população estudada; fornece ferramentas importantes para análises bioquímicas e predição de alterações na estrutura tridimensional da molécula do FIX e melhora o entendimento da relação genótipo/fenótipo. Um total de 52 pacientes masculinos com hemofilia B está incluído no estudo. A estratégia utilizada para a detecção de mutações na hemofilia B foi iniciada pela investigação da presença de grandes deleções, utilizando-se a técnica de PCR. Não foram encontradas, porém, quaisquer grandes deleções. A seguir, foi feito o sequenciamento direto dos 8 éxons do gene do fator IX e suas regiões flangeadoras. Os produtos de PCR foram purificados para o sequenciamento e, após, essas amostras foram encaminhadas a uma empresa terceirizada para o sequenciamento. Serão apresentados resultados dos éxons 1 a 8, nos quais foram encontradas 19 diferentes mutações, sendo 15 mutações de sentido trocado, 1 pequena deleção de dois nucleotídeos e 3 mutações sem sentido. Esses resultados foram comparados com as informações existentes no banco de dados mundial e estudos específicos anteriores desenvolvidos no Brasil, Argentina e México.

## **ABSTRACT**

Hemophilia B (HB) is a hemorrhagic disorder caused by the reduction or absence of activity from the coagulation Factor IX (FIX), due to mutations in the protein encoding gene. The pattern of inheritance is sex-linked recessive. The activated FIX, along with the activated Factor VIII (FVIII), originates the intrinsic Xase complex, which leads to the activation of Factor X (FX). The activated FX transforms prothrombin into thrombin, which converts fibrinogen into fibrin, resulting in blood clot. The FIX gene is located on chromosome Xq27.1, comprises 33kb and is arranged in 8 exons (a-h). There are 1,094 described mutations that result in Hemophilia B in its severe, moderate or mild forms, and more than half of these mutations are associated with Hemophilia B's severe form. The overall purpose of the present study is to present the molecular characterization of mutations in patients diagnosed with Hemophilia B who are residents in Rio Grande do Sul. This study on mutations allows a better understanding of molecular genetics of the disease in the analyzed population; it also provides important tools for biochemical analyses and for the prediction of changes in the three-dimensional structure of the FIX molecule, and it improves the understanding of the genotype/phenotype relationship. A total of 52 male patients diagnosed with Hemophilia B, is included in the study. The strategy used to detect mutations in Hemophilia B was first to examine the presence of major deletions, using PCR methods. No large deletions, however, were found. Afterwards, we performed the direct sequencing of the 8 exons of the Factor IX gene and its flanking regions. The PCR products were purified for the sequencing process, and then these samples were sent to a third-party company for sequencing. The results for exons 1 to 8 are presented; we found 19 different mutations, from which 15 are missense mutations, 1 is a small deletion of two nucleotides and 3 are non-sense mutations. These results were compared with those of the world database and specific previous studies performed in Brazil, Argentina and Mexico.

### 1. Hemostasia

O termo hemostasia inicialmente foi utilizado com o sentido de prevenção da perda de sangue, hoje, ele serve para descrever um processo fisiológico que tem como objetivo manter o sangue em estado fluido dentro dos vasos sanguíneos, sem que haja hemorragia ou trombose. Toda vez que um vaso sanguíneo sofre lesão ou ruptura, a hemostasia é mantida por meio de vários mecanismos distintos, que incluem (1) espasmo vascular; (2) formação do tampão plaquetário; (3) coagulação sanguínea; e (4) crescimento de tecido fibroso no coágulo sanguíneo para obturar o orifício no vaso de forma permanente. Mais especificamente, imediatamente após a ocorrência de corte ou ruptura do vaso sanguíneo, o estímulo do vaso traumatizado determina, instantaneamente, a contração de sua parede, o que reduz o fluxo de sangue. Se a ruptura for muito pequena – e muitos orifícios vasculares muito pequenos formam-se a cada dia, a abertura é quase sempre ocluída por um tampão plaquetário. O processo de coagulação, por sua vez, é iniciado por substâncias ativadoras, tanto na parede vascular traumatizada quanto nas plaquetas, e por proteínas sanguíneas que são aderidas à parede vascular lesada (Guyton & Hall, 2011).

A exposição do subendotélio, após um dano vascular, provoca uma adesão das plaquetas ao colágeno. O Fator von Willebrand (FvW) é uma glicoproteína multimérica encontrada no plasma e nas plaquetas, e suas principais funções são promover a adesão e agregação plaquetária e estabilizar e proteger o Fator VIII (FVIII) da degradação proteolítica. Ele forma uma rede de microfilamentos entre as fibras de colágeno e uma glicoproteína específica na superfície das plaquetas (GPIb). As plaquetas que são aderidas ao colágeno mudam a sua forma,

tornando-se mais esféricas e liberando grânulos citoplasmáticos com ADP, cálcio, tromboxano e serotonina, os quais atraem outras plaquetas para o local da lesão. O aumento de cálcio livre no citosol é um aspecto muito importante na ativação plaquetária, uma vez que aumenta a agregação entre plaquetas. O tromboxano e a serotonina também induzem a vasoconstrição, que serve para limitar a velocidade do fluxo de sangue no local injuriado (Marcus & Safier, 1993; Koeppen & Stanton, 1996).

### **1.1. A Via Clássica da Coagulação Sanguínea**

A cascata de coagulação clássica foi proposta por Davie & Ratnoff (1964) para explicar a função dos vários fatores de coagulação durante a formação do coágulo de fibrina. Quando a coagulação é iniciada, cada fator de coagulação é convertido para uma forma ativa. Essa ativação ocorre num efeito cascata, onde a ativação de um fator induz a ativação de outro, e assim por diante.

Os mecanismos que iniciam a coagulação sanguínea podem ser desencadeados por traumatismo da parede vascular e dos tecidos adjacentes, pelo contato do sangue com células endoteliais lesadas, ou com outros elementos teciduais fora do endotélio vascular. Em cada caso, ocorre a formação do complexo ativador de protrombina, que causa, então, a conversão da protrombina em trombina. O ativador da protrombina pode ser formado de duas maneiras básicas, embora, na realidade, ambas interajam constantemente: (1) pela via extrínseca, que começa com o traumatismo da parede vascular e dos tecidos adjacentes; e (2) pela via intrínseca, que inicia no próprio sangue. Tanto na via extrínseca quanto na via intrínseca, diferentes proteínas plasmáticas desempenham funções importantes. Essas proteínas são denominadas fatores da coagulação sanguínea e em sua maior parte constituem-se em formas inativas de enzimas proteolíticas. Quando convertidas nas formas ativas, suas ações enzimáticas determinam as reações sucessivas em cascata do processo da coagulação.

A via intrínseca inicia com a ativação do Fator XII e a liberação de fosfolípidos plaquetários. O Fator XII ativado atua enzimaticamente sobre o Fator XI para ativá-lo também, constituindo a segunda etapa do mecanismo intrínseco. Essa reação também requer cininogênio de alto peso molecular, sendo acelerada pela pré-caliceína. O Fator XI ativado atua, então, enzimaticamente sobre o Fator IX, ativando-o também. O Fator IX ativado, atuando em combinação com o Fator VIII e com os fosfolípidos plaquetários e o Fator Tissular (FT) provenientes das plaquetas traumatizadas, ativa o Fator X. Esse fator atua na formação do ativador da protrombina. Por sua vez, o ativador da protrombina inicia em poucos segundos a clivagem da protrombina para formar trombina, acionando, dessa maneira, o processo final da coagulação (Tuddenham & Cooper, 1994; Schenone *et al.*, 2004).

O mecanismo extrínseco para iniciar a formação do complexo ativador de protrombina começa com a lesão da parede vascular ou de tecidos extravasculares e ocorre de acordo com as três etapas básicas seguintes. Primeiramente, ocorre a liberação da tromboplastina tecidual (fator tissular, IRFT). O FT é necessário para a ativação de Fator VII (FVII) e, juntos, o FT e o FVII ativado ativam os fatores X e IX. O FIX ativado (FIXa) também ativa o FX. O Fator X, como na via intrínseca, atua na formação do ativador da protrombina que termina por formar a trombina, finalizando o processo de coagulação (Tuddenham & Cooper, 1994; Schenone *et al.*, 2004).

Outros contribuintes muito importantes nesse processo de coagulação, em termos de números de sítios, são as membranas de plaquetas, que, quando ativadas, expressam sítios de ligação para os complexos do fator IXa/fator VIIIa (complexo “tenase”) e fator Xa/fator Va (complexo “protrombinase”), aumentando ainda mais a eficiência da coagulação sanguínea.

Não obstante a tradição de se dividir o sistema de coagulação do sangue em intrínseco e extrínseco, tal separação é atualmente entendida como inadequada do ponto de vista da fisiologia da coagulação, tendo em vista que a divisão não ocorre *in vivo*. Adicionalmente, alterações conceituais ocorreram desde a descrição do modelo de cascata no que diz respeito à importância relativa

das duas vias e, hoje, é aceito que essas vias não atuam separadamente, mas interagem de modo complementar (Bolton-Maggs & Pasi, 2003). A Figura 1 apresenta um esquema simplificado dos processos envolvidos na conversão da trombina, segundo o modelo atual.

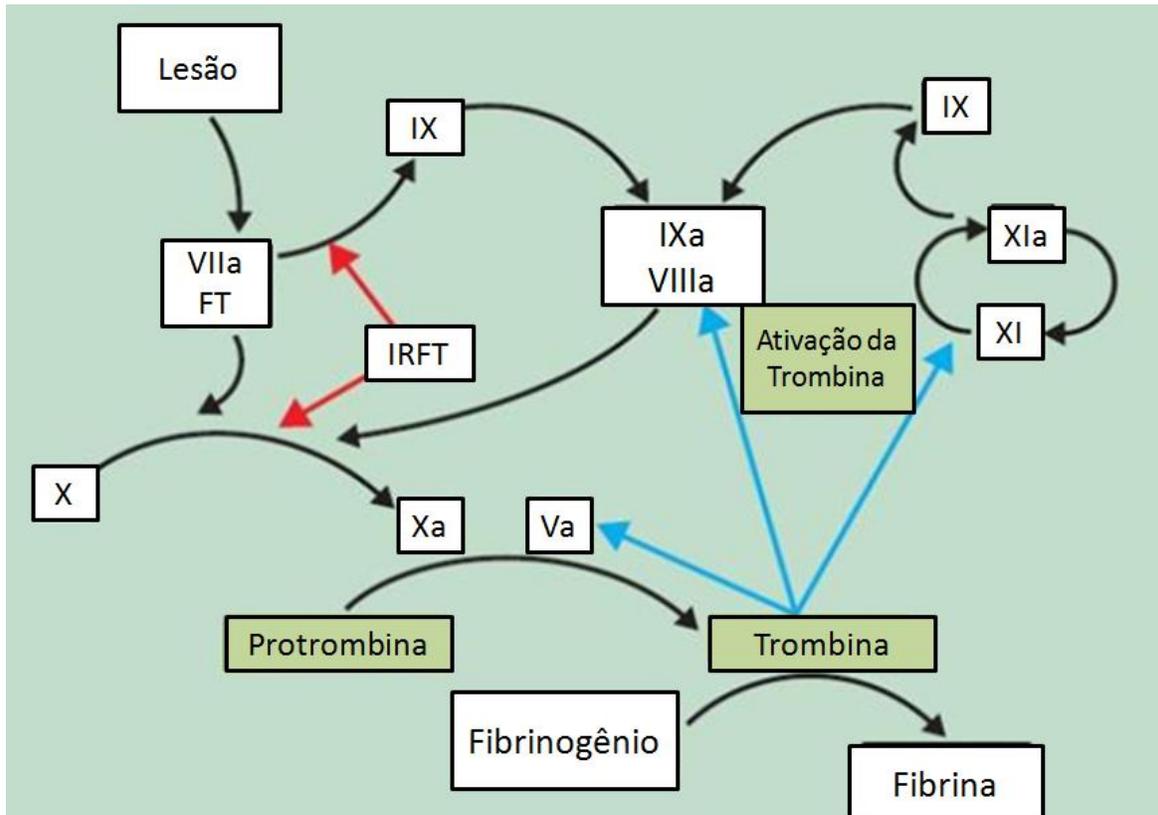


Figura 1: Esquema geral da formação da rede de fibrina.

No que se refere ao sistema de coagulação, a utilização dos termos “intrínseco” e “extrínseco” pode ser ainda útil na interpretação de exames laboratoriais, utilizados na rotina da avaliação da hemostasia: o Tempo de Protrombina (TP), o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) e a dosagem de Fatores de Coagulação, que são de particular importância no diagnóstico de anormalidades hemostáticas e na monitorização da terapêutica anticoagulante. Na execução desses testes *in vitro*, criam-se, no tubo de reação, as condições para ativação preferencial das vias ditas extrínseca (avaliada pelo TP) e intrínseca (avaliada pelo TTPA) (Franco, 2001).

## 1.2. O Modelo Celular da Coagulação

Com o tempo, o modelo cascata de coagulação revelou-se insuficiente para correlacionar os resultados clínicos com exames laboratoriais específicos de triagem, como TP e TTPA, e para explicar o papel das células no controle da coagulação com base em estudos de fluxo sanguíneo (Baker & Brassard, 2011). Em 2001, Hoffman & Monroe propuseram um novo modelo baseado em células, enfatizando a interação dos fatores de coagulação em superfícies celulares específicas. Esse modelo representa o entendimento atual da hemostasia e baseia-se em três etapas (iniciação, amplificação e propagação) que ocorrem em diferentes tipos celulares.

A iniciação está localizada em células especiais que expressam o fator tissular, levando à formação dos fatores Xa, IXa e trombina, suficientes para iniciar o processo de coagulação. A amplificação ocorre na superfície das plaquetas ativadas que acumulam os cofatores V e VIII. Finalmente, na fase de propagação, ocorre o recrutamento de plaquetas circulantes pelas plaquetas ativadas, configurando uma geração de trombina com magnitude suficiente para formar a fibrina para estabilizar o tampão plaquetário (Hoffman & Monroe, 2001; Hoffman, 2003). A Figura 2 ilustra o modelo celular da coagulação.

O Fator Tissular é uma glicoproteína de membrana de 45.000 daltons (Da), que funciona como receptor para o fator VII da coagulação. Em indivíduos normais, níveis baixos (1%) da forma ativada do fator VII da coagulação (FVIIa) estão presentes na circulação. O FVIIa é capaz de se ligar ao FT expresso em membranas celulares, e a exposição do FT ao plasma resulta na sua ligação ao FVII e FVIIa, sendo que somente o complexo FT-FVIIa exibe função enzimática ativa; o complexo é também capaz de ativar o FVII em processo denominado de “auto-ativação”. O complexo FT-FVIIa tem como substratos principais o fator IX e o fator X, cuja clivagem resulta na formação de FIXa e FXa, respectivamente, com subsequente formação de trombina e fibrina. Deve ser ressaltado, no entanto, que

quantidades mínimas de trombina são geradas a partir do complexo “protrombinase” extrínseco. Porém, uma vez que há gênese inicial de trombina, esta enzima é capaz de ativar o fator V em fator Va, e o fator VIII em fator VIIIa. As duas reações, envolvendo a ativação de procofatores, são fundamentais para a geração do complexo “tenase” intrínseco (fator IXa/fator VIIIa), o qual converte o fator X em fator Xa, e do complexo “protrombinase” (fator Va/fator Xa), que converte a protrombina em trombina. Um importante aspecto dessas reações é que o complexo fator IXa/fator VIIIa ativa o fator X com eficiência 50 vezes maior que o complexo fator VIIa/FT. O produto principal das citadas reações, a trombina (IIa), exibe atividades procoagulantes, convertendo o fibrinogênio em fibrina, promovendo a ativação plaquetária e estabilizando o coágulo de fibrina (Hoffman & Monroe, 2001).

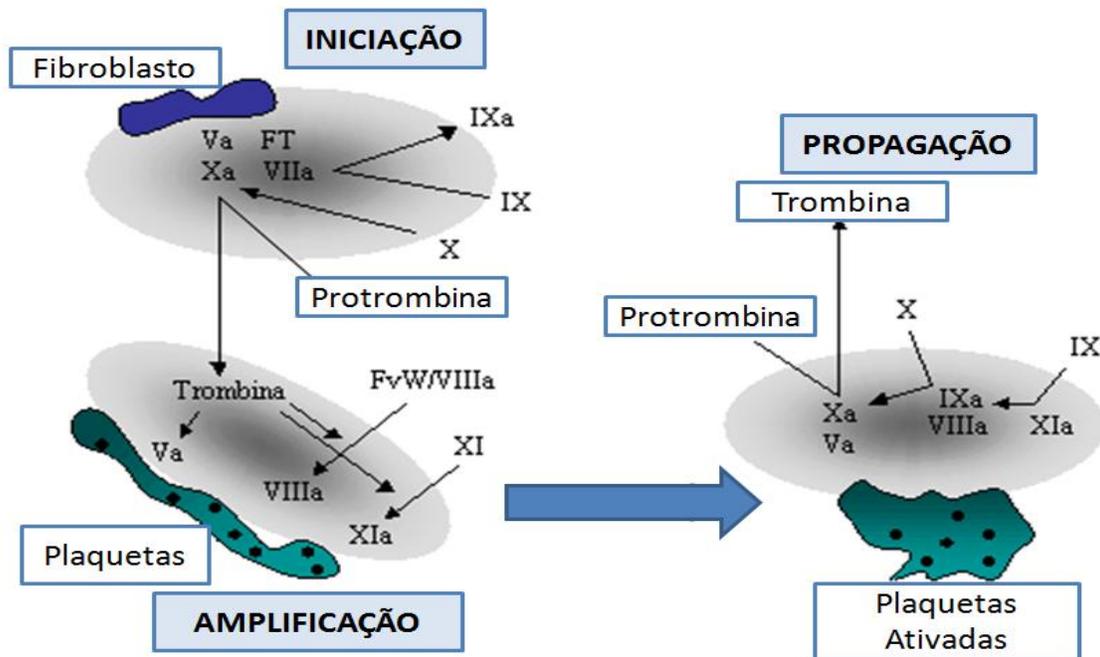


Figura 2: Modelo celular de coagulação (modificado de Hoffman & Monroe, 2001).

### **1.3. As Hemofilias**

As Hemofilias A e B, juntamente com a Doença de Von Willebrand, são as coagulopatias hereditárias de maior prevalência na população mundial e resultam em sangramentos prolongados. As Hemofilias A e B caracterizam-se pela redução da atividade dos fatores da coagulação VIII e IX, respectivamente. A hemofilia A é responsável por 75% a 80% dos casos, e a hemofilia B, por 20% a 25% dos mesmos (Tuddenham & Cooper, 1994).

#### **1.3.1. A Hemofilia B**

A Hemofilia B (HB) é uma doença hemorrágica causada pela redução ou ausência da atividade do Fator IX da coagulação (FIX), devido a mutações no gene que codifica a proteína. O padrão de herança é recessivo ligado ao sexo. (Rezende *et al.*, 2009).

A prevalência da doença é de 1 em cada 25.000 a 30.000 homens no mundo (Casaña *et al.*, 2009). A Tabela 1 apresenta a incidência da hemofilia nos países com maior número de casos relatados; e o Brasil é o segundo país com maior ocorrência de hemofilia B, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. No ano de 2012, no Brasil, em razão do avanço no diagnóstico e no aumento de registros, houve um crescimento de 6,8% no número total de pacientes quando comparado ao total dos pacientes cadastrados até o ano de 2011. Há uma pequena diferença de quatro pacientes, entre os números fornecidos nas Tabelas 1 e 2 relativos a esse ano, compreensível porque são derivados de banco de dados diferentes. Em 2012, o total de pacientes com coagulopatias hereditárias no Brasil atingiu o número de 18.552 pacientes, dos quais 1.801 (9,71%) correspondem à hemofilia B (Tabela 2). Dados obtidos do sistema Hemovida Web

Coagulopatias em 2012 mostram que cerca de 15% dos pacientes hemofílicos estão sem informação quanto à gravidade dos sintomas (Ministério da Saúde, 2014).

Tabela 1: Número de hemofílicos nos países de maior ocorrência de casos.

<i>Países</i>	<i>Hemofilia A</i>	<i>Hemofilia B</i>
<b>Estados Unidos</b>	13.276	4.209
<b>Brasil</b>	8.839	1.719
<b>Índia</b>	11.586	1.687
<b>China</b>	8.921	1.261
<b>Reino Unido</b>	5.424	1.151
<b>França</b>	4.704	1.031
<b>Japão</b>	4.475	971
<b>Egito</b>	3.861	967
<b>Irã</b>	4.386	932
<b>Turquia</b>	3.926	725

(World Federation of Hemophilia, 2011).

Tabela 2: Prevalência das coagulopatias hereditárias e demais transtornos hemorrágicos por diagnóstico, Brasil, 2011-2012.

Diagnóstico	2011		2012	
	Nº	%	Nº	%
Hemofilia A	8.848	50,94%	9.122	49,17%
Hemofilia B	1.723	9,92%	1.801	9,71%
Doença de von Willebrand	4.934	28,41%	5.445	29,35%
Outras coagulopatias hereditárias e demais transtornos hemorrágicos	1.865	10,74%	2.184	11,77%
<b>Total</b>	<b>17.370</b>	<b>100%</b>	<b>18.552</b>	<b>100%</b>

(Ministério da Saúde, 2014).

### **1.3.2. Classificação, Sintomatologia e Diagnóstico da Hemofilia B**

Os pacientes com HB apresentam uma deficiência na atividade do fator IX de coagulação que resulta em sangramentos espontâneos ou pós-trauma. A idade de diagnóstico e a frequência de episódios de hemorragia são relacionados com o nível da atividade desse fator. Segundo a Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia (ISTH), são considerados casos graves aqueles em que a atividade do fator IX (IX: C) é <1% da atividade normal, moderados quando apresentam atividade entre 1 e 5%, e leves quando a atividade do fator IX está entre 5 e 40% (White *et al.*, 2001). O Ministério da Saúde do Brasil segue essa classificação (Veiga *et al.*, 2008).

Na hemofilia B grave, o sangramento espontâneo é o sintoma mais frequente. Indivíduos com essa doença são geralmente diagnosticados durante os primeiros dois anos de vida, e na ausência de tratamento profilático eles podem ter entre dois e cinco episódios de sangramento espontâneos a cada mês.

Os indivíduos com hemofilia B moderada raramente têm sangramento espontâneo e geralmente são diagnosticados antes da idade de cinco a seis anos; a frequência de episódios de sangramento varia de uma vez por mês para uma vez por ano.

Os indivíduos com a hemofilia B leve não têm episódios de sangramento espontâneo, porém ocorre sangramento anormal em cirurgias ou extrações dentárias. A frequência de sangramento pode variar de uma vez por ano a uma vez em cada dez anos. Os indivíduos com hemofilia B leve muitas vezes não são diagnosticados no início da vida (Konkle *et al.*, 2011). A Tabela 3, modificada de White, *et al.* (2011) nos mostra as diferentes gravidades da hemofilia B com seus respectivos sintomas, quantidade de fator IX, e frequência relativa ao total de hemofílicos B, sendo essa última em nível mundial.

Tabela 3: Diferentes tipos de hemofilia B, sintomas, atividade do fator IX e frequência em nível mundial.

<b>Hemofilia B</b>	<b>Sintomas</b>	<b>FIX:C</b>	<b>Frequência</b>
<b>Grave</b>	Hematúria, epistaxe, melena/hematêmese, hematomas, sangramentos retroperitoniais, intra-articulares ou intracranianos	<1%	<b>50%</b>
<b>Moderada</b>	Hematomas, hematúria, epistaxe, gengivorragias, melena/hematêmese	1-5%	<b>30%</b>
<b>Leve</b>	Hematomas, cirurgias, extrações dentárias	5-40%	<b>20%</b>

(modificado de White *et al.*,2011).

### 1.3.3. O Fator IX (FIX)

O FIX é uma glicoproteína plasmática dependente de vitamina K, sintetizada inicialmente nos hepatócitos como uma proteína precursora de peso molecular de 57 kDa (Di Scipio *et al.*, 1978). É também conhecida como zimogênio (forma inativa) da serino-protease, a qual é ativada proteoliticamente, de acordo com a via de coagulação celular, pelo complexo Fator VIIa/fator tecidual, o que resulta na formação de sua forma ativada FIXa (Schmidt & Bajaj, 2003). Um outro fator responsável pela ativação do FIX é o Fator XIa, o qual se torna ativado pelo Fator XIIa, que por sua vez se torna ativado após a interação do fator XII com o cininogênio de alto peso molecular, a pré-caliceína e o colágeno expostos na superfície endotelial após a lesão do vaso sanguíneo (Davie & Ratnoff, 1964).

Durante a biossíntese, o FIX sofre várias modificações pós-traducionais. Essas incluem  $\gamma$ -carboxilação dos primeiros 12 resíduos Glu;

glicosilação em Asn-157, Asn-159, Ser-53, Ser-61, Tir-159, Tir-169, e Tir-172; hidroxilação parcial de Asp-64; sulfatação de Tir-155; fosforilação de Ser-158, e remoção do sinal e de todas as sequências do propeptídeo (Konkle *et al.*, 2011) .

A ativação do FIX ocorre no plasma após a clivagem em duas regiões (Arg145-Arg146 e Arg180-Val181) resultando na formação das cadeias leve (N-terminal de 145 aminoácidos e peso molecular de 16 kDa) e pesada (C-terminal de 234 aminoácidos e peso molecular de 29 kDa), as quais são unidas por uma única ponte dissulfídica entre os resíduos de cisteína 132 e 279.

O FIX ativado, em complexo com o fator VIII (FVIII) ativado, forma o complexo Xase intrínseco, o qual leva à ativação do fator X (FX). O FX ativado transforma a protrombina em trombina, a qual converte fibrinogênio em fibrina, formando o coágulo sanguíneo (Tuddenham & Cooper, 1994; Schenone *et al.*, 2004).

#### 1.3.4. O Gene e a Estrutura do FIX

O gene do FIX, clonado em 1982, localiza-se no cromossomo Xq27.1 (Figura 3), ele compreende 33kb e está organizado em 8 éxons (a-h). Os íntrons representam 92% da sequência, com 30 quilobases (kb), e os éxons, constituem, portanto, os 8% restantes (3kb) (Choo *et al.*, 1982).

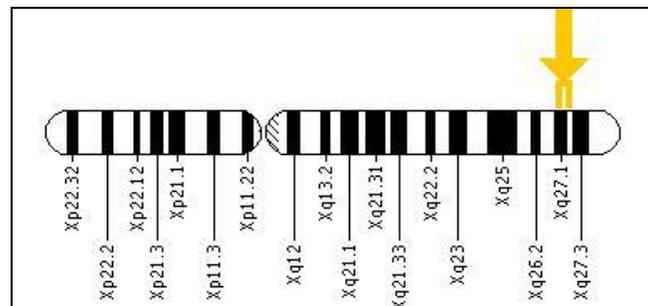


Figura 3: Localização do gene do FIX.

O RNA mensageiro (mRNA) do fator IX compreende 2.803 nucleotídeos que codificam um polipeptídeo precursor de 461 aminoácidos. Após o processamento do peptídeo sinal e do propeptídeo, origina-se uma proteína madura de 415 aminoácidos (Schmidt & Bajaj, 2003).

O gene, RNA mensageiro, proteína precursora e a proteína madura do FIX, juntamente com os domínios de ligação, são mostrados na Figura 4.

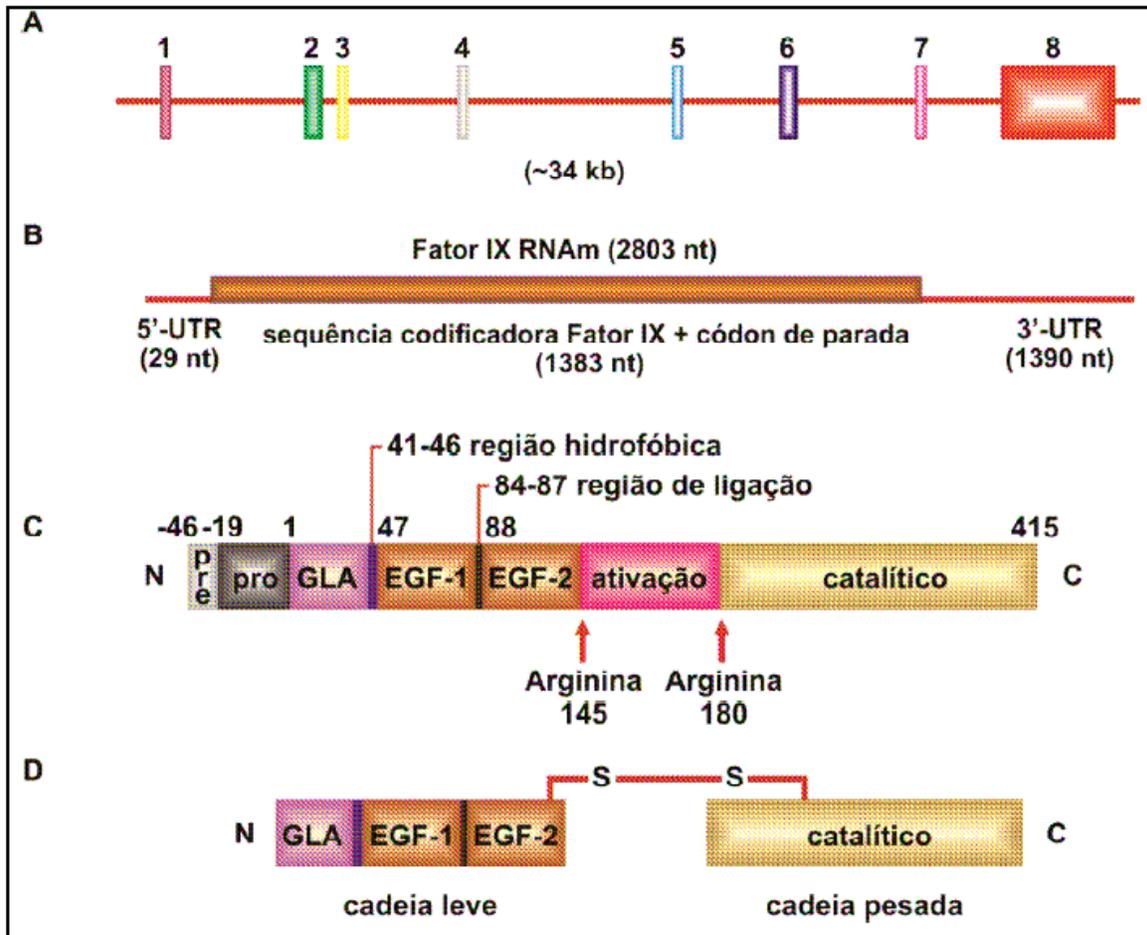


Figura 4: Gene, RNA mensageiro, proteína precursora e proteína madura do FIX. (A) Organização genômica do gene FIX humano, os éxons estão numerados de 1 - 8. (B) RNA mensageiro do FIX mostrando as regiões 5' e 3'UTR e a região codificadora. (C) proteína de FIX precursora, compreendendo as sequências PRÉ (peptídeo sinal), PRÓ (propeptídeo) e com um peptídeo maduro de 415 aminoácidos, que contém a região de ativação (peptídeo de ativação). (D) FIX ativado composto por cadeia leve (N-terminal) e uma cadeia pesada (C-terminal) unidas por uma ponte dissulfídica entre os resíduos de cisteína 132 e 279. Possui as regiões GLA (domínio GLA), EGF (domínios de fator de crescimento) e catalítico (domínio serino-protease) (modificado de Bowen, 2002).

O FIX forma um complexo ternário com o FT e o FVIIa. A Figura 5 ilustra esse complexo, modelado por Chen et al. (2002). De acordo com este modelo, GLA e EGF1 são domínios de ligação do FIX com TF.

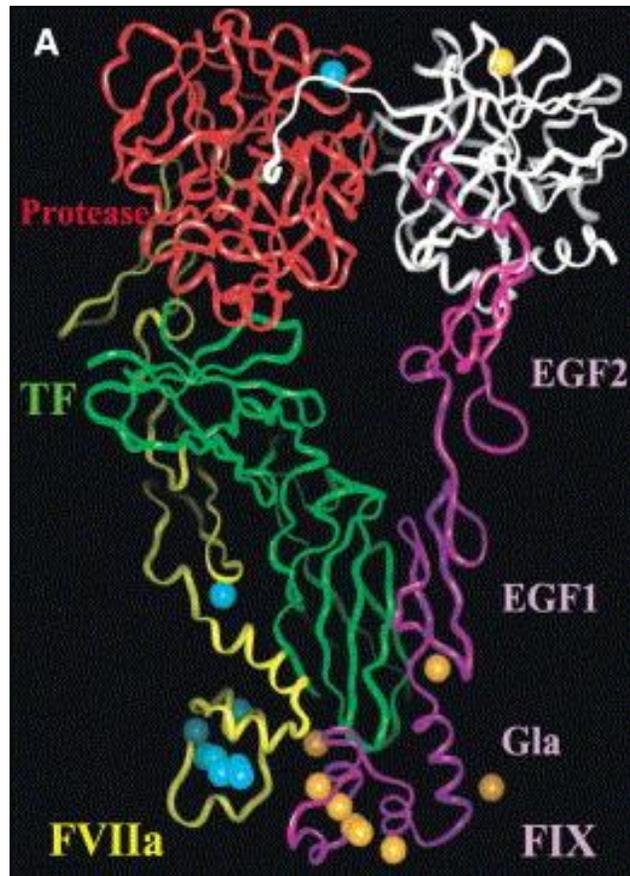


Figura 5. Ilustração do complexo ternário de FT / FVIIa com FIX. FT está representado em verde, a cadeia pesada (domínio de protease) de FVIIa está em vermelho, e a cadeia leve (Gla, EGF1, EGF2) está em amarelo. A cadeia pesada (domínio de protease) do FIX está em branco e a cadeia leve (Gla, EGF1, EGF2) está em púrpura. Os íons  $Ca^{2+}$  ligados ao FVIIa são mostrados em ciano e aqueles vinculados à FIX são mostrados em laranja (modificado de Chen et al., 2002).

### **1.3.5. Mutações no Gene do FIX e a Hemofilia B**

De acordo com o banco de dados online The Haemophilia B Mutation Database (<http://www.factorix.org>) (Rallapalli *et al.*, 2013), existem 1.094 mutações descritas que resultam em hemofilia B nas formas grave, moderada ou leve. Quase a metade (42,9%) dessas mutações estão associadas à forma grave da doença, 23,3% à forma moderada, 15,9% à forma leve e 17,8% não contêm dados acerca da gravidade da hemofilia. Entre as mutações de ponto, 72% resultam na mudança de um aminoácido da sequência original, 16% levam à criação de códons de parada, 6% dão origem a um processamento do RNA mensageiro alterado ou ausente e 6% as pequenas deleções. No Brasil, existem 61 casos registrados nesse banco de dados, representando 1,6% do total de casos descritos.

### **1.3.6 Estudos Específicos sobre a Investigação Molecular de Mutações no gene do FIX**

Mesmo não sendo o objetivo da presente dissertação, devemos destacar alguns dados de publicações acerca das mutações que causam a hemofilia B. De acordo com pesquisa feita no PUBMED, setenta e oito artigos foram publicados nos últimos cinco anos, nenhum desses publicado no Brasil. No Brasil, o único estudo realizado sobre as mutações na hemofilia B é o de Figueiredo *et al.*(1993). Nesse estudo foram descritas pela primeira vez no mundo 3 mutações diferentes, sendo 2 grandes deleções (1 deleção do gene inteiro do FIX e 1 deleção dos éxons 1 a 3), bem como uma mutação sem sentido (Arg298\*). Existem outros pesquisadores brasileiros que estudaram mutações no gene do FIX, mas não publicaram os resultados. No banco de dados de Rallapalli *et al.* (2013) existem 47 mutações de ponto descritas em 61 pacientes no Brasil (Tabela 4). Já o estudo do Radic *et al.* (2013), foi o mais recente em toda América Latina. Esse foi o primeiro grande estudo feito na população hemofílica B da Argentina. Foram detectadas,

nas 55 famílias analisadas, 47 mutações, sendo 10 descritas pela primeira vez. Estudos com a população do México são mais antigos (Thorland *et al.*,1995; Jaloma-Cruz *et al.*,2000), nesses estudos foram detectadas, respectivamente, 20 e 8 mutações no gene do FIX.

Tabela 4: Lista das mutações detectadas em pacientes brasileiros que não foram formalmente descritas em artigos científicos (Rallapalli *et al.*,2013).

	<b>Localização</b>	<b>Mutação</b>	<b>Fontes de referência no banco</b>
1	<b>c.83G&gt;A</b>	<b>p.Cys28Tyr</b>	Szajner et al
2	<b>c.88+5G&gt;A</b>	<b>Splice</b>	Bandinelli et al
3	<b>c.89-1G&gt;A</b>	<b>Splice</b>	Pestana et al
4	<b>c.89-1G&gt;C</b>	<b>Splice</b>	Bandinelli et al
5	<b>c.127C&gt;T</b>	<b>p.Arg43Trp</b>	Bandinelli et al
6	<b>c.128G&gt;A</b>	<b>p.Arg43Gln</b>	Bandinelli et al
7	<b>c.128G&gt;T</b>	<b>p.Arg43Leu</b>	Bandinelli et al
8	<b>c.164T&gt;G</b>	<b>p.Phe55Cys</b>	Bandinelli et al
9	<b>c.187G&gt;A</b>	<b>p.Glu63Lys</b>	Araujo et al
10	<b>c.214G&gt;T</b>	<b>p.Glu72*</b>	Figueiredo et al
11	<b>c.223C&gt;T</b>	<b>p.Arg75*</b>	Figueiredo; Bandinelli; Szajner
12	<b>c.224G&gt;A</b>	<b>p.Arg75Gln</b>	Figueiredo et al
13	<b>c.252+1G&gt;A</b>	<b>Splice</b>	Figueiredo et al
14	<b>c.278-1G&gt;A</b>	<b>Splice</b>	Araujo et al
15	<b>c.278A&gt;G</b>	<b>p.Asp93Gly</b>	Szajner et al
16	<b>c.391+1G&gt;A</b>	<b>Splice</b>	Szajner et al
17	<b>c.391+7A&gt;G</b>	<b>Splice</b>	Szajner et al
18	<b>c.400T&gt;C</b>	<b>p.Cys134Arg</b>	Araujo et al
19	<b>c.422G&gt;T</b>	<b>p.Cys141Phe</b>	Araujo et al
20	<b>c.479G&gt;A</b>	<b>p.Gly160Glu</b>	Pestana et al
21	<b>c.520delG</b>	<b>p.Val174Cysfs*29</b>	Araujo et al
22	<b>c.520+2T&gt;C</b>	<b>Splice</b>	Figueiredo et al
23	<b>c.521-3T&gt;G</b>	<b>Splice</b>	Araujo et al
24	<b>c.532T&gt;C</b>	<b>p.Cys178Arg</b>	Szajner et al
25	<b>c.572G&gt;T</b>	<b>p.Arg191Leu</b>	Pestana et al
26	<b>c.676C&gt;T</b>	<b>p.Arg226Trp</b>	Szajner et al
27	<b>c.677G&gt;A</b>	<b>p.Arg226Gln</b>	Bandinelli et al
28	<b>c.781T&gt;G</b>	<b>p.Trp261Gly</b>	Figueiredo et al
29	<b>c.835G&gt;A</b>	<b>p.Ala279Thr</b>	Szajner et al
30	<b>c.880C&gt;T</b>	<b>p.Arg294*</b>	Szajner et al
31	<b>c.881G&gt;A</b>	<b>p.Arg294Gln</b>	Szajner et al

	Localização	Mutação	Referência
32	c.892C>T	p.Arg298*	Bandinelli et al
33	c.905A>G	p.His302Arg	Bandinelli et al
34	c.1004G>C	p.Cys335Ser	Pestana et al
35	c.1025C>T	p.Thr342Met	Pestana et al
36	c.1079T>C	p.Phe360Ser	Szajner et al
37	c.1130T>A	p.Val377Asp	Figueiredo et al
38	c.1135C>T	p.Arg379*	Szajner et al; Figueiredo et al.
39	c.1136G>A	p.Arg379Gln	Figueiredo et al
40	c.1180A>G	p.Met394Val	Szajner et al.,
41	c.1193G>C	p.Gly398Ala	Figueiredo et al
42	c.1219T>A	p.Cys407Ser	Szajner et al
43	c.1240C>A	p.Pro414Thr	Szajner et al
44	c.1280G>C	p.Gly427Ala	Szajner et al
45	c.1304G>A	p.Cys435Tyr	Szajner et al
46	c.1357T>A	p.Trp453Arg	Szajner et al
47	c.1372delA	p.Glu456fs*	Figueiredo et al

## CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS

---

O presente estudo tem por **objetivo geral** a caracterização molecular das mutações em pacientes diagnosticados com hemofilia B residentes no Rio Grande do Sul.

Os **objetivos específicos** são: (a) correlacionar os tipos de alterações encontradas com a prevalência de mutações já descritas no gene do Fator IX; e (b) contribuir para um melhor conhecimento dos pacientes que vivem em nosso meio, visando estratégias de manejo e aconselhamento genético diferenciadas.

### 3.1. Coleta de amostras

Um total de 52 pacientes masculinos, distribuídos em 36 famílias diferentes, com hemofilia B foi incluído no estudo. Esse número de pacientes refere-se ao número total de hemofílicos com dados no HEMOCENTRO-RS. Os pacientes foram encaminhados de maneira regular ao nosso Laboratório, por médicos atuantes no HEMOCENTRO-RS. Eles foram entrevistados e foi realizada a coleta de 5 a 10 ml de sangue periférico por punção venosa. O sangue foi centrifugado para a obtenção do plasma sem plaquetas, o qual foi utilizado para a realização das análises bioquímicas (ensaios de coagulação). O material restante foi utilizado para a extração de DNA dos leucócitos.

Os participantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, (ver Anexo 1), conforme os pontos previstos nas resoluções CNS n° 196/96 e n° 347/05, sendo que uma cópia foi entregue aos familiares e demais cópias para os profissionais envolvidos no projeto. Como pode ser verificado, nesse Termo de Consentimento estão expostos os objetivos do trabalho e o que será feito com o material coletado de cada paciente. Além disso, nos responsabilizamos pela comunicação dos resultados, pelo material biológico coletado e pelo esclarecimento de qualquer dúvida que possa existir por parte dos familiares interessados. O Projeto correspondente foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (Carta de Aprovação n. 2007700).

### **3.2. Ensaio de Coagulação e Extração do Material Genético**

A atividade coagulante do fator FIX (FIX:C) é medida pelo método de um estágio baseado no tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) (Austen & Rhymes, 1975) e a presença e a quantificação de inibidores anti-FIX é feita pelo método Bethesda modificado (Kasper *et al.*, 1975). A pesquisa de mutações no gene do FIX foi realizada com o DNA genômico, extraído de leucócitos do sangue periférico dos pacientes, através do método descrito por Lahiri & Nurnberger (1991).

### **3.3. Detecção de Mutações, Sequenciamento do DNA e Análise de Dados**

A estratégia utilizada para a detecção de mutações na hemofilia B foi iniciada pela investigação da presença de grandes deleções, utilizando-se a técnica de PCR simples com 8 pares de primers (Tabela 5). As deleções são o segundo tipo de mutação mais encontrada, presentes em aproximadamente 15 a 20% dos pacientes. Essas mutações incluem a deleção inteira ou parcial do gene, bem como deleções internas e microdeleções de um ou vários pares de bases, podendo ocasionar perda de domínios da proteína e da sua atividade, levando ao quadro grave da doença. Nos pacientes que não apresentaram grandes deleções, foi feito o sequenciamento direto dos 8 éxons do gene do fator IX e suas regiões flancoadoras, a começar pelo éxon 8 (éxon de maior tamanho) utilizando-se os mesmos 8 pares de primers indicados na Tabela 5. Os produtos de PCR foram purificados para o sequenciamento e, a seguir, as amostras foram encaminhadas a uma empresa terceirizada para o sequenciamento (Figuras 6 e 7).

Tabela 5. Sequências de oligonucleotídeos para a amplificação do gene do fator IX com as regiões flanqueadoras.

Região	Sequência (5' - 3')	Posição <sup>1</sup>	Tamanho do Fragmento
promotora e éxon 1	AGCTACAGGCTGGAGACAATA TTTAGTGAAGAAGACAGCATCAG	-471-451 +175+197	668pb
éxon 2	TTGGCTTTCAGATTATTTGGAT AAAGATTTTCTATTCTATGCTCTGC	+6216+6237 +6521+6544	329pb
éxon 3	ATAGGAAATCAATACAAAACACTT TATGGGTTAGAGGGTTGGACT	+6613+6637 +6819+6839	227pb
éxon 4	AATCAGACTCCCATCCCAAT TCCAGTTTCAACTTGTTTCAGA	+10299+10318 +10548+10569	271pb
éxon 5	GACCCATACATGAGTCAGTAGTT AAGGAAGCAGATTCAAGTAGG	+17584+17606 +17878+17899	315pb
éxon 6	TACTGATGGGCCTGCTTCTC AATAGCCTCAGTCTCCACCT	+20244+20263 +20621+20641	398pb
éxon 7	CTATTCCTGTAACCAGCACACA CGACGTGGGTTCTGAAATTA	+29956+29977 +30279+30298	343pb
éxon 8	GTCAGTGGTCCCAAGTAGTC GGAAAGTGATTAGTTAGTGAGAG	+30738+30758 +31421+31443	705pb

<sup>1</sup> Numeração de Costa *et al* (2000).

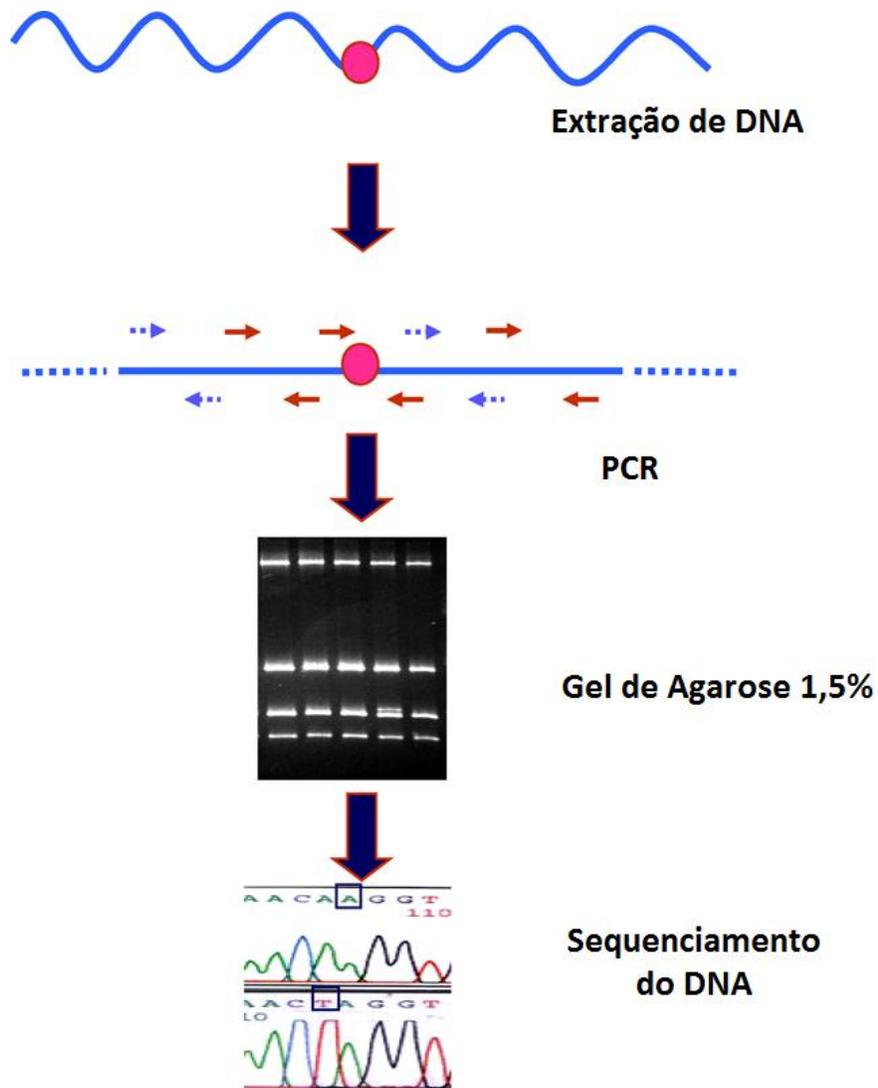


Figura 6: A estratégia utilizada para a detecção de mutações. Essa estratégia inclui a amplificação do gene *F9* (éxon e as suas regiões flangeadoras, 5'UTR e 3'UTR) por PCR, seguida por detecção de mutações por sequenciamento de DNA (modificado de Jayandharan *et al.*, 2012)

A Figura 7 apresenta uma representação esquemática da estratégia utilizada.

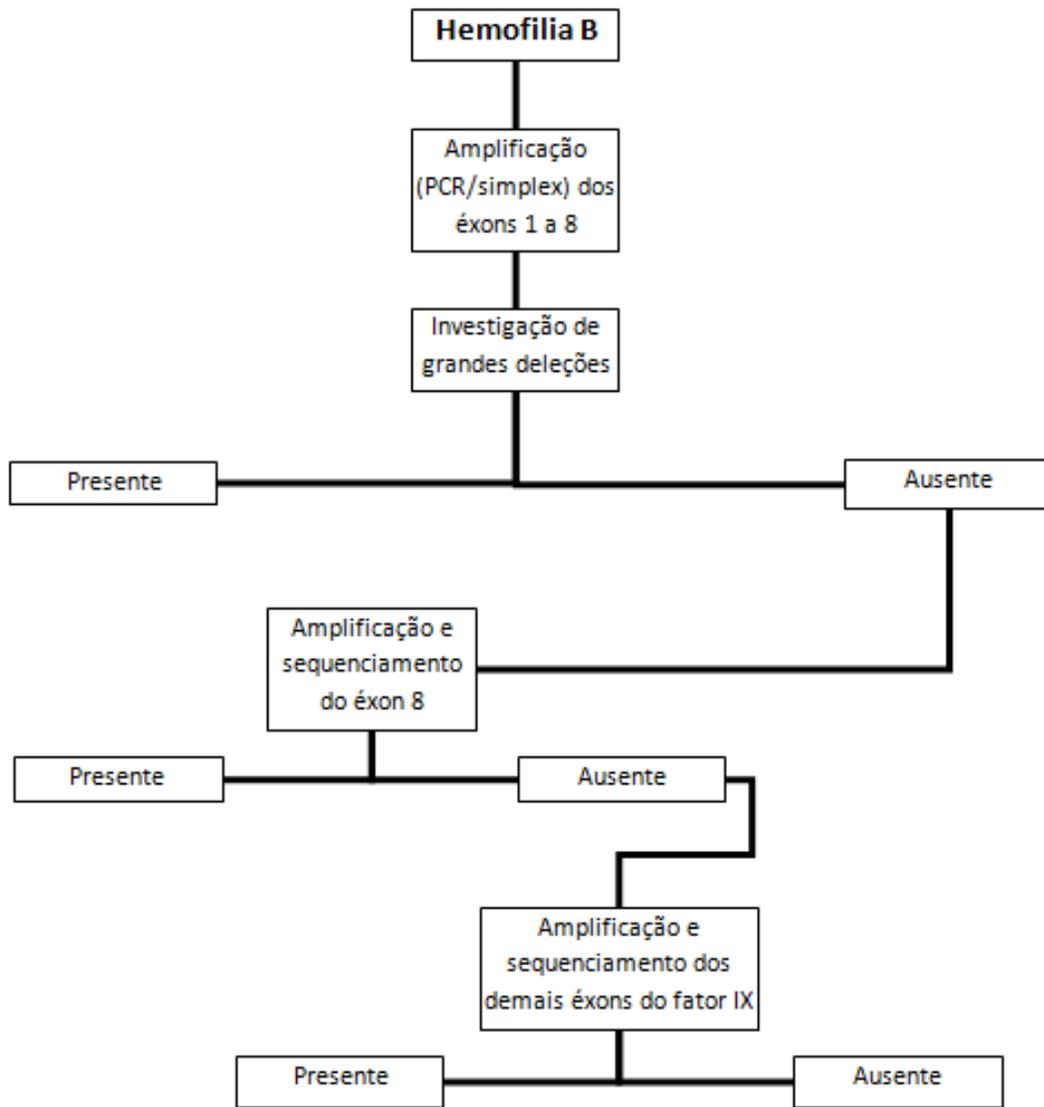


Figura 7. Fluxograma para a detecção de mutações na hemofilia B.

As sequências do gene do FIX dos pacientes foram comparadas com sequências referência do FIX do banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), através do alinhamento pelo programa CodonCode Aligner implementado no MEGA 5.04. Se encontrada uma mutação, ela foi comparada com as listadas no banco de dados (<http://www.factorix.org>). Todas as mudanças de sequência foram confirmadas em ambas as fitas de DNA, e analisadas pelo alinhamento com a sequência normal.

Para comparar as distribuições das mutações encontradas em domínios, seu tipo e quadro clínico com a informação existente no banco de dados de Rallapalli *et al.*(2013) foram utilizados o teste de qui-quadrado e o teste exato de Fisher pelo software WINPEPI versão 11.39.

## CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Inicialmente, pela técnica de PCR simples, não foi verificada a presença de grandes deleções. Foram sequenciados todos os éxons do DNA do gene para o FIX de 52 pacientes em 36 famílias; dos 52 afetados, 50% apresentavam a forma grave da doença, 42,3% a moderada, e 7,7% a leve (Tabela 6). Vinte e cinco famílias estão, agora, com a mutação descrita; 19 diferentes mutações foram encontradas, sendo 15 mutações de sentido trocado (78,9%), 3 mutações sem sentido (15,8%) e 1 pequena deleção de dois nucleotídeos (5,3%). A Tabela 6 mostra informações sobre essas mutações. De todas as mutações encontradas, 2 estão sendo descritas aqui pela primeira vez.

A pequena deleção (Arg358Serfs\*15), detectada através de sequenciamento direto do éxon 8, envolve a perda de dois nucleotídeos (adenina e guanina). Essa mutação foi encontrada em duas famílias não aparentadas (Tabela 7).

Tabela 6: Número de pacientes estudados nas famílias em cada grau da hemofilia B.

Famílias	Número de Pacientes	Grau da Hemofilia
1	2	leve
2	1	grave
3	1	moderado
4	1	moderado
5	8	moderado
6	1	grave
7	2	moderado
8	1	moderado
9	1	grave
10	2	grave
11	1	grave
12	1	moderado
13	1	grave
14	1	grave
15	1	grave
16	1	grave
17	1	moderado
18	4	2 graves e 2 moderados
19	1	grave
20	1	grave
21	1	grave
22	1	grave
23*	1	grave
24	1	grave
25	2	moderado
26	1	grave
27	2	moderado
28	1	grave
29	1	leve
30	1	leve
31	1	grave
32	1	grave
33	1	grave
34	1	grave
35	1	grave
36	2	1 grave e 1 moderado
<b>Total</b>	<b>52 pacientes</b>	<b>26 graves (50%), 22 moderados (42,3%), 4 leves (7.7%)</b>

\*Família com desenvolvimento de inibidor para o FIX.

Tabela 7: Resumo das mutações encontradas.

Tipo de mutação	Efeito da mutação	Domínio atingido na proteína	Localização (éxon)	Número de famílias com a mutação	Descrição da mutação
Ponto	Sentido trocado	Pró-peptídeo	2	2	Arg43Gln
Ponto	Sentido trocado	Pró-peptídeo	2	1	Arg43Trp
Ponto	Sem sentido	GLA	2	1	Arg75*
Ponto	Sentido trocado	EGF2	5	1	Cys134Arg
Ponto	Sentido trocado	EGF2	5	1	Val153Ala
Ponto	Sentido trocado	EGF2	5	2	Cys157Arg
Ponto	Sentido trocado	EGF2	5	2	Cys170Tyr
Polimorfismo	Sentido trocado	Peptídeo de ativação	6	11	Ala194Thr
Ponto	Sentido trocado	Peptídeo de ativação	6	2	Arg226Gln
Ponto	Sem sentido	Serina protease	8	2	Arg298*
Ponto	Sentido trocado	Serina protease	8	1	His302Arg
Ponto	Sentido trocado	Serina protease	8	2	Thr342Met
Deleção	Erro de leitura	Serina protease	8	2	Arg358Serfs*15
Ponto	Sem sentido	Serina protease	8	1	Tyr371*
Ponto	Sentido trocado	Serina protease	8	1	Val374Phe
Ponto	Sentido trocado	Serina protease	8	1	Lys387Asn
Ponto	Sentido trocado	Serina protease	8	1	Ile390Thr
Ponto	Sentido trocado	Serina protease	8	1	Gly413Arg
Ponto	Sentido trocado	Serina protease	8	1	Gly432Val

A Tabela 8 fornece maiores detalhes sobre essas mutações, nas 25 famílias em que foram detectadas. Como indicado anteriormente, a pequena deleção encontrada (Arg358Serfs\*15) ocorre em duas famílias com a forma grave da hemofilia e sem quaisquer outras mutações nessas famílias.

Tabela 8: Relação das mutações encontradas ao longo dos éxons nas 25 famílias e sua atividade do fator IX.

Família	Exon 2	Exon 5	Exon 6	Exon 8	Atividade do FIX	Gravidade da hemofilia
2				Arg358Serfs*15	<1	grave
6	Arg75*				<1	grave
10		Cys157Arg <sup>1</sup>	Ala194Thr		<1	grave
11	Arg43Gln		Ala194Thr		<1	grave
13		Cys157Arg <sup>1</sup>	Ala194Thr		<1	grave
14			Arg226Gln / Ala194Thr		<1	grave
15		Cys170Tyr			<1	grave
16				Gly413Arg	<1	grave
19			Ala194Thr	Val374Phe	<1	grave
20				Arg298*	<1	grave
21			Arg226Gln		<1	grave
22		Cys170Tyr			<1	grave
31				Arg358Serfs*15	<1	grave
32			Ala194Thr	Arg298*	<1	grave
33		Cys134Arg			<1	grave
34			Ala194Thr	Tyr371* / Lys387Asn	<1	grave
35	Arg43Gln				<1	grave
18			Ala194Thr	Ile390Thr	<1/1/1,2	grave/moderado
3				Gly432Va	1.8	moderada
4				Thr342Met	5	moderada
8				Thr342Met	5	moderada
12				His302Arg	5	moderada
17	Arg43Trp		Ala194Thr		2.3	moderada
29		Val153Ala <sup>1</sup>	Ala194Thr		25	leve
30			Ala194Thr		14	leve

<sup>1</sup>mutações não descritas no banco de dados (<http://www.factorix.org/>).

As mutações de sentido trocado (missense) Arg43Gln (em 2 famílias), Cys134Arg, Cys157Arg (2 famílias), Cys170Tyr (2 famílias), Val374Phe, Lys387Asn, e Gly413Arg foram encontradas em famílias com a forma grave da hemofilia. A mutação Ile390Thr foi encontrada em uma família com 4 pacientes, sendo dois graves e dois moderados, porém com atividade do fator FIX próxima a 1%. Também foi encontrada, em duas famílias, a mutação Arg226Gln, em dois pacientes diagnosticados com a forma grave. Já as mutações Arg43Trp, Gly432Va, Thr342Met (2 famílias) e His302Arg estão presentes em famílias com a forma moderada e a mutação Val153Ala em família com a forma leve.

As mutações do tipo *nonsense* (sem sentido) correspondem a 15,8% do total das mutações encontradas na nossa amostra, sendo Arg75\* encontrada em 1 família com a forma grave e Arg298\* e Tyr371\* associadas à forma grave da doença e encontradas em famílias distintas.

O polimorfismo Ala194Thr foi encontrado em 11 famílias distribuídas nos três níveis de gravidade da hemofilia, acompanhando outras mutações em 10 dessas 11 famílias. Esse polimorfismo está localizado no éxon 6, responsável pelo peptídeo sinal da proteína do FIX.

Quanto às duas mutações de sentido trocado, descritas aqui pela primeira vez, Val153Ala e Cys157Arg, elas ocorrem no éxon 5 do domínio EGF2, cujas funções são a ligação com íons de cálcio e a ligação do FIX aos fatores VIII e X. A primeira ocorre em família com a forma leve e a segunda em 2 famílias com a forma grave.

Duas mutações de grande efeito ocorrem simultaneamente no mesmo paciente: Tyr371\* e Lys387Asn aparecem em paciente com a forma grave; como elas ocorrem em regiões próximas no éxon 8, podem ter se formado por recombinação não-homóloga. Essas mutações estão presentes no domínio da serina protease, a porção catalítica da molécula e sua cadeia pesada. Este domínio proporciona o reconhecimento, recrutamento e ativação do FX em FXa.

#### 4.1. Discussão

Em qualquer estudo como o presente, é importante verificar a possibilidade de desvios de amostragem, quando comparados ao total conhecido até o momento. Três comparações relacionadas a diferentes aspectos do presente estudo com os dados equivalentes registrados por Rallapelli *et al.* (2013) estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Análise estatística comparativa de três diferentes aspectos do presente estudo com o total conhecido até o momento.

Grupo de Característica	Subgrupo de Características	Presente Estudo	Banco de dados	X <sup>2</sup>	GL	P
Quadro clínico	Grave	18(72)	470(52)	4,042	2	0,133
	Moderado	5(20)	255(29)			
	Leve	2(8)	174(19)			
Distribuição em domínios	Pró-peptídeo	2(10,5)	29(3,9)	-	-	0,0432*
	GLA	1(5,3)	108(14,4)			
	EGF2	4(21)	86(11,5)			
	Peptídeo de ativação	2(10,5)	22(2,9)			
	Serina protease	10(52,7)	503(67,3)			
Tipo de mutação	Sentido trocado	15(78,9)	596(67)	-	-	0,3042*
	Sem sentido	3(15,8)	86(9,7)			
	Pequena deleção	1(5,3)	123(13,8)			
	Processamento alterado	0(0)	84(9,5)			

\*Valor P de Fisher

As comparações relacionadas ao quadro clínico, distribuição das mutações em domínios e tipos de mutação, foram todas semelhantes às obtidas no banco de dados geral. Há uma predominância de casos graves nos dois conjuntos

(respectivamente 72% e 52%); de mutação no domínio serina protease (52,7% e 67%), que é realmente o maior; e de mutações de sentido trocado (78,9% e 67%). Na distribuição em domínios, no entanto, há alguma diferença nas categorias menos frequentes ( $P=0,04$ ) a segunda mais frequente no presente estudo sendo no domínio EGF2 e no banco de dados GLA.

Grandes deleções envolvem perdas de 50 ou mais nucleotídeos. No banco de dados da hemofilia (Rallapalli *et al.*, 2013), das 182 deleções, 25 são consideradas grandes deleções. As deleções, grandes ou pequenas, são o segundo tipo mais frequente de mutação, estando presentes em aproximadamente 5 a 10% dos pacientes; tais mutações envolvem a deleção inteira ou parcial do gene e estão associadas à forma clínica grave da hemofilia B. (Bowen, 2002). A pequena deleção encontrada no presente estudo, Arg358Serfs\*15, só havia sido encontrada em um indivíduo, na França e, também, está associada à forma grave da hemofilia (Costa *et al.*, 2000). Não foram encontradas, aqui, grandes deleções.

As inserções, bem como as deleções, podem envolver poucos ou muitos nucleotídeos e afetam a atividade proteica. Por outro lado, inversões são muito raras dentre os hemofílicos B. No presente estudo não foram encontradas inversões.

A Tabela 10 fornece informação, com mais detalhes, sobre a comparação presente estudo/banco de dados. São consideradas as mutações específicas, o quadro clínico de seus portadores, e as regiões onde esses pacientes foram estudados fora do Rio Grande do Sul.

Tabela 10: Recorrência das mutações de sentido trocado identificadas no presente estudo, como indicado no banco de dados <http://www.factorix.org/> e sua associação com as formas clínicas da hemofilia B.

Domínio	Mutação	Quadro clínico no presente estudo <sup>1</sup>	Ocorrência em outras amostras	Quadro clínico respectivo <sup>1</sup>
Própeptídeo	Arg43Gln	G	85 pacientes na América, Europa e Ásia.	G, M, L
Própeptídeo	Arg43Trp	M	65 pacientes na América, Europa e Ásia.	G, M, L
EGF2	Cys134Arg	G	9 pacientes na França, Alemanha, Itália, Reino Unido e Brasil.	G
EGF2	Val153Ala	L	Não descrita antes.	
EGF2	Cys157Arg	G	Não descrita antes.	
EGF2	Cys170Tyr	G	6 pacientes sendo 1 na China, 1 na Índia, 1 no Reino Unido, 1 nos Estados Unidos e 2 pacientes na Itália.	G, M
Peptídeo sinal	Arg226Gln	G	52 pacientes na América, Europa e Ásia.	G, M, L
Serina protease	His302Arg	M	2 pacientes no Brasil e Espanha.	L
Serina protease	Thr342Met	M	128 pacientes na América, Europa e Ásia.	G, M, L
Serina protease	Val374Phe	G	11 pacientes na Europa e Ásia.	G, M
Serina protease	Lys387Asn	G	1 paciente no Reino Unido.	L
Serina protease	Ile390Thr	G, M	2 pacientes na Austrália e França.	M
Serina protease	Gly413Arg	G	7 pacientes na Europa e Estados Unidos.	G, M, L
Serina protease	Gly432Val	M	2 pacientes na	G, M, L

			Espanha e Estados Unidos.	
--	--	--	---------------------------	--

<sup>1</sup>G: Grave; M: Moderada; L: Leve.

Como pode ser verificado, a mutação encontrada com mais frequência em todo o mundo é Thr342Met (128 pacientes registrados). Também encontradas frequentemente são Arg43Gln (85 pacientes) e Arg43Trp (65) e Arg226Gln (52). As outras têm sido registradas em menor número (de 1 a 11). No que se refere à gravidade clínica que elas condicionam, nossos dados, de uma maneira geral, concordam com os obtidos em outros estudos, com exceção de His302Arg (quadro clínico moderado no paciente da presente amostra, leve em dois outros pacientes) e Lys387Asn (grave em nosso estudo, leve em um paciente do Reino Unido).

As mutações *nonsense* (sem sentido), nas quais é adicionado um códon de parada, ocorrem geralmente em códons CGA. O gene do FIX apresenta seis desses códons e a troca da base nitrogenada C para T resulta no códon de parada TGA, levando a uma forma de hemofilia grave (Bowen, 2002). A mutação Arg75\*, encontrada por nós em paciente com quadro clínico grave, havia sido encontrada em outros 73 indivíduos espalhados pelo Brasil, Argentina, Alemanha, França, Índia, Itália, Reino Unido e Estados Unidos; desses, 79,5% são portadores da forma grave da hemofilia, 6,8% da forma moderada e 13,3% estão sem informação acerca da gravidade da doença.

A mutação Arg298\* foi encontrada no presente estudo em um paciente com a forma grave da doença e essa já foi detectada em 63 pacientes com a forma grave (68,2%) e moderada (14,3%) da doença. Essa mutação foi detectada no Brasil, Portugal, China, França, Alemanha, Índia, Espanha e Estados Unidos. Já a mutação Tyr371\*, portador com a forma grave, só havia sido encontrada em 3 pacientes, na Alemanha (forma grave), Espanha (forma moderada) e Estados Unidos (forma grave).

De todas as mutações encontradas neste estudo, 52,6% (10) estão localizadas no éxon 8, 21,1% (4) no éxon 5, 15,8% (3) no éxon 2 e 10,5% (2) no éxon 6. O éxon 8, como mencionado anteriormente, faz parte da cadeia pesada do

FIX e proporciona o reconhecimento, recrutamento e ativação do FX em FXa; já o éxon 5 faz parte do domínio EGF2, cujas funções são a ligação com íons de cálcio e a ligação do FIX aos fatores VIII e X. O éxon 2 ocorre no pró-peptídeo e no domínio GLA onde ocorre a ligação do FIX ao complexo FT/FVII, enquanto o éxon 6 codifica o peptídeo de ativação, que é clivado pelo Fator VII e XI para produzir FIX ativado.

O polimorfismo Ala194Thr no contexto de detecção de mutações na hemofilia B tem sido explorado para a detecção de portadores da hemofilia. Embora o significado funcional desta substituição não seja ainda claramente entendido, as variações étnicas em suas frequências alélicas sugerem ser ela apenas um polimorfismo neutro (Mahajan *et al.*, 2007).

O tipo de mutação nos mostra não somente a gravidade da hemofilia B, mas também a capacidade que o paciente tem em desenvolver anticorpos inibidores do fator IX durante a terapia de tratamento. As mutações que resultam na ausência da proteína, entre elas, as mutações do tipo *nonsense* e deleções, estão ligadas a grande risco para o desenvolvimento de inibidores (Bowen, 2002). De todas as famílias aqui estudadas, no entanto, apenas uma apresentava o desenvolvimento de inibidores para o FIX; porém, nenhuma mutação foi detectada nessa família.

Relacionando as mutações encontradas por nós com as mutações descritas em toda América Latina, podemos verificar que Arg43Trp, Arg75\*, Arg226Gln, Arg298\* e Thr342Met também foram encontradas na Argentina (Radic *et al.*, 2013). Thr342Met foi, também, encontrada numa população mexicana (Thorland *et al.*, 1995), assim como Arg43Gln e Gly413Arg. Já no Brasil, Arg43Trp, Arg43Gln, Arg75\*, Cys134Arg, Arg226Gln, Arg298\*, His302Arg e Thr342Met foram também detectadas em estudos anteriores, porém sem publicação científica.

Resumindo, das 19 diferentes mutações encontradas no presente estudo, oito (42%) já haviam sido detectadas no Brasil. A mutação Thr342Met foi encontrada tanto na presente amostra como por outro pesquisador no Brasil, sendo, também, detectada na Argentina e no México. Seis mutações foram

detectadas em duas amostras brasileiras e na Argentina, e duas outras tanto no Brasil quanto no México.

## 4.2. Perspectivas

Para verificar o efeito das mutações na proteína do fator IX serão realizados dois tipos de abordagens: uma com a proteína do fator IX isolada e outra com determinados sítios do FIX que interagem com outras proteínas. Para a abordagem isolada do fator IX, irá ser feita a modelagem por homologia da proteína de indivíduos saudáveis, bem como das proteínas que apresentam as mutações descritas, utilizando o software MODELLER 9v8.

Existem ferramentas na área da bioinformática que predizem um possível impacto das mutações na forma e função de uma proteína. Será verificada também uma diferença de afinidade intermolecular decorrente de mutações pontuais e/ou grandes deleções. Essa predição do efeito das mutações será realizada pelo programa PolyPhen. Mesmo que as mutações novas sejam preditas como benignas, será feita uma análise da posição dessas mutações e o seu possível efeito na proteína.

Em nosso trabalho, a frequência de famílias sem mutação identificada foi de 31% (11/36). Para a identificação da alteração genética nesses pacientes, seriam necessárias novas abordagens. Por exemplo, analisar os íntrons, já que mutações nessas regiões podem causar processamento alternativo e alterar a proteína do fator IX. Mutações sem sentido ou outras mutações nas sequências consenso de processamento ou próximas a essas sequências nas junções éxon-íntron serão analisadas, no futuro, pelo programa de predição desses sítios ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)).

É necessário, também, avaliar a relação de parentesco desconhecida pelos próprios indivíduos, o que implicaria no aparecimento de uma mesma alteração em mais de um desses pacientes.

O presente trabalho faz parte de um grande projeto de longa duração sobre os fatores que alteram de alguma forma a hemostasia. Projeto esse que foi iniciado por Israel Roisenberg (conferir Roisenberg, 1968) e continuado por Eliane Bandinelli e Francisco M. Salzano. Ao longo desses anos foram desenvolvidos diversos trabalhos, em diferentes níveis acadêmicos, de investigação que envolveram não somente as hemofilias como também a Doença de von Willebrand e aspectos diversos da trombofilia. Essas pesquisas contribuem para um melhor conhecimento desses pacientes que vivem em nosso meio, visando estratégias de manejo e aconselhamento genético diferenciadas, e serão continuadas.

Nos últimos anos houve verdadeiros avanços no aconselhamento genético para a hemofilia devido à biologia molecular. Com a mutação identificada na família é possível testar as mulheres que carregam o alelo mutado e realizar um aconselhamento genético direcionado para uma possível pré-implantação de embrião para casais que desejam ter filhos. A pré-implantação permite aos casais testar e selecionar embriões saudáveis e efetuar assim, uma implantação com segurança sobre a inexistência do gene mutado da hemofilia, eliminando, deste modo, o diagnóstico pré-natal por meios invasivos, de maior risco. Todos os pacientes investigados no presente estudo retornam periodicamente para acompanhamento no Hemocentro-RS; planeja-se fornecer a informação obtida para eles e familiares, especialmente às portadoras potenciais, visando o aconselhamento genético quanto a opções reprodutivas futuras.

## CAPÍTULO 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Austen DEG, Rhymes IL (1975). A Laboratory Manual of Blood Coagulation. Blackwell, Oxford, 109 pp.

Baker DC, Brassard J (2011). Review of Continuing Education Course on Hemostasis. Portola Pharmaceuticals, San Francisco, USA.

Bolton-Maggs PHB, Pasi JK (2003). Haemophilias A and B. Lancet, 361: 1801-1809.

Bowen, D.J. (2002). Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. Molecular Pathology, 55; 1-18.

Casaña P, Haya S, Cid AR, Oltra S, Martínez F, Cabrera N, Aznar JA (2009) Identification of deletion carriers in hemophilia B: quantitative real-time polymerase chain reaction or multiple ligation probe amplification. Transl Res 153:114-117.

Chen SW, Pellequer JL, Schved JF, Giansily-Blaizot M (2002). Model of a ternary complex between activated factor VII, tissue factor and factor IX. Thromb Haemost, 88: 74–82.

Choo KH, Gould KG, Rees DJ, Brownlee GG (1982). Molecular cloning of the gene for human anti-haemophilic factor IX. Nature, 299: 178–180.

Costa JM, Ernault P, Vidaud D, Vidaud M, Meyer D, Lavergne JM (2000). Fast and efficient mutation detection method using multiplex PCR and cycle sequencing-- application to haemophilia B. *Thromb Haemost* 83:244-247.

Davie EW, Ratnoff OD (1964). Watterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*, 145: 1310-1312.

Di Scipio RG, Kurachi K, Davie EW (1978). Activation of human factor IX (Christmas factor). *J Clin Invest*, 61:1528-1538.

Figueiredo MS (1993). Molecular analysis of hemophilia B in Brazilian patients. *Braz J Med Biol Res* 26:919-931.

Franco RF (2001). Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. *Medicina, Ribeirão Preto*, 34: 229-237.

Guyton AC, Hall JE (2011). *Tratado de Fisiologia Médica*. Editora Elsevier, Rio de Janeiro, pp.338-346.

Hoffman M (2003). A cell-based model and the role of FVIIa. *Blood Reviews*, 17: 51-55.

Hoffman M, Monroe DM (2001). A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*, 85: 958-965.

Jaloma-Cruz AR, Scaringe WA, Drost JB, Roberts S, Li X, Barros-Núñez P, Figuera LE, Rivas F, Cantú JM, Sommer SS (2000). Nine independent F9 mutations in the Mexican hemophilia B population: nonrandom recurrences of point mutation events in the human germline. *Hum Mutat* 15:116-117.

Jayandharan G, Srivastava A, Srivastava A (2012). Role of molecular genetics in hemophilia: from diagnosis to therapy. *Semin Thromb Hemost*, 38:64–78.

Kasper C, Aledort LM, Counts RB, Edson JR, Fratantani J, Green D *et al.* (1975). A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemost*, 34: 896-872.

Koeppen BM & Stanton BA (1996). Hemostasia e coagulação do sangue. In: Berne R, Levy MN. *Fisiologia*. Guanabara Koogan, São Paulo, 321-338.

Konkle BA, Josephson NC, Nakaya Fletcher SM, Thompson AR (2011). Hemophilia B. In: *GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource* [database online]. University of Washington, Seattle, 1997-2010. Disponível em <http://www.genetests.org>

Lahiri DK, Nurnberger J (1991). A rapid nonenzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucl Acids Res*, 19: 5444.

Mahajan A, Chavali S, Ghosh S, Kabra M, Chowdhury MR, Bharadwaj D, Consortium IGV (2007). Allelic heterogeneity of molecular events in human coagulation factor IX in Asian Indians. *Mutation in brief #965*. Online. *Hum Mutat* 28:526.

Marcus AJ, Safier LB (1993). Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB*, 7: 516-522.

Ministério da Saúde (2014). Perfil das coagulopatias hereditárias no Brasil: 2011-2012. Secretaria da atenção à saúde. Coordenação-geral de sangue e hemoderivados. Ministério da Saúde, Brasília.

Radic CP, Rossetti LC, Abelleyro MM, Candela M, Pérez Bianco R, de Tezanos Pinto M, Larripa IB, Goodeve A, De Brasi C (2013). Assessment of the F9 genotype-specific FIX inhibitor risks and characterisation of 10 novel severe F9 defects in the first molecular series of Argentinian patients with haemophilia B. *Thromb Haemost* 109:24-33.

Rallapalli, P.M., Kemball-Cook, G., Tuddenham, E.G., Gomez, K., Perkins, S.J (2013). An interactive mutation database for human coagulation factor IX provides novel insights into the phenotypes and genetics of haemophilia B. *J.Thromb.Haemost.* available from: PM:23617593

Rezende SM, Pinheiro K, Caram C, Genovez G, Barca D (2009). Registry of inherited coagulopathies in Brazil: first report. *Haemophilia*, 15: 142–149.

Roisenberg, I. (1968). Hemofilia e estados hemofilioides no Rio Grande do Sul. Frequência, fisiologia e herança. Tese de Doutorado, Faculdade de Filosofia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Schenone M, Furie BC, Furie B (2004). The blood coagulation cascade. *Curr Opin Hematol*, 11: 272-277.

Schmidt AE, Bajaj SP (2003). Structure/function relationships in factor IX and factor IXa. *Trends Cardiovasc Med*, 13:39-45.

Thorland EC, Weinshenker BG, Liu JZ, Ketterling RP, Vielhaber EL, Kasper CK, Ambriz R, Paredes R, Sommer SS (1995). Molecular epidemiology of factor IX germline mutations in Mexican Hispanics: pattern of mutation and potential founder effects. *Thromb Haemost* 74:1416-1422.

Tuddenham EGD, Cooper DN (1994). FVIII and Hemophilia A. *Oxford Monog Med Genet*, 25: 19-76.

Veiga MTA, Montalvão SAL, Rezende SM (2008). Hemofilia Congênita e Inibidor: Manual de Diagnóstico e Tratamento de Eventos Hemorrágicos. Ministério da Saúde do Brasil, Brasília.

White GC, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J, Factor VIII and Factor IX Subcommittee (2001). 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.

World Federation of Hemophilia (2013). Report on the Annual Global Survey 2011. Disponível em: <http://www1.wfh.org/publications/files/pdf-1488.pdf> Acesso em 03 de novembro de 2013.

Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Projeto de pesquisa: **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS MUTAÇÕES EM PACIENTES COM HEMOFILIA B**

Pesquisador responsável: Francisco M. Salzano (Departamento de Genética)

Pesquisadores participantes: Eliane Bandinelli, Francisco M. Salzano, Anderson Pantoja (Departamento de Genética)

A Hemofilia B é uma anomalia hemorrágica resultante da deficiência do fator IX da coagulação. A hemofilia B, de caráter genético, ocorre devido a alterações na parte do DNA que é responsável pela produção do fator IX. Existem inúmeras alterações no material genético dos indivíduos que podem estar associadas com a hemofilia B e de acordo com o tipo de alteração os sintomas podem ser mais ou menos graves.

Por meio deste documento gostaríamos de convidá-lo a participar deste projeto de pesquisa, que tem como objetivo a caracterização molecular da hemofilia B em pacientes do Rio Grande do Sul.

A sua participação envolve o preenchimento de uma ficha clínica e a doação de 5ml de sangue. O volume coletado não tem repercussão sobre seu organismo e o único desconforto que você poderá sentir será a dor da picada da agulha e eventualmente a formação de um pequeno hematoma.

Sua amostra de sangue será usada para a extração de DNA (seu material genético). É no DNA que pesquisaremos o tipo de alteração que causa hemofilia. É importante esclarecer que não faremos nenhum outro tipo de exame senão aqueles destinados a estudar sua hemofilia.

Sua participação no estudo é sigilosa e voluntária. Caso você decida não participar, isto não afetará no atendimento e no tratamento normal que você tem direito. As informações são confidenciais e as conclusões serão utilizadas para publicações em revistas científicas e congressos científicos, sempre com total sigilo das identidades dos pacientes.

Além disso, você tem liberdade de desistir de participar do estudo a qualquer momento sem nenhum prejuízo. Seu material genético e seus registros médicos serão sempre tratados confidencialmente, e os resultados deste estudo poderão ser usados para fins científicos de forma anônima.

O presente projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O estudo será financiado por verba de agências de fomento, sendo que nenhum custo incidirá sobre o paciente ou seus familiares.

Garantimos que todos os procedimentos realizados estão de acordo com as normas previstas nas resoluções do Conselho Nacional de Saúde nº 196/96 e nº 347/05 e que lhe será entregue uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido.

O material genético excedente poderá ser armazenado ou não, conforme a decisão de cada paciente. O material que ficar armazenado poderá ser utilizado em novos exames ou para uso em novas pesquisas sobre hemofilia. No caso de serem propostas novas pesquisas com este material, elas serão avaliadas pelos Comitês de Ética em Pesquisa local e nacional.

Em caso de dúvidas, favor entrar em contato com o Comitê de Ética da UFRGS (fone:3308-3629) ou com os pesquisadores Eliane Bandinelli (fone: 3308-6736, Francisco M. Salzano (3308-6747)

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### PROJETO: **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS MUTAÇÕES EM PACIENTES COM HEMOFILIA B**

Eu, \_\_\_\_\_, declaro que fui convidado a participar do projeto de pesquisa "**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS MUTAÇÕES EM PACIENTES COM HEMOFILIA B**" acima citado. Fui informado de que minha decisão em participar não comprometerá meu tratamento, sendo meus dados e resultados de meus testes absolutamente sigilosos. Além disso, fui informado de que a qualquer momento posso solicitar minha desistência do estudo, sem qualquer prejuízo para meu tratamento. Declaro que consinto em

participar do estudo e que meus dados sejam incluídos na análise coletiva dos resultados.

Com relação ao armazenamento de material genético eu declaro que:

( ) SIM: autorizo manter meu material genético excedente (DNA) armazenado, sabendo que poderá ser usado, no futuro, para novas pesquisas em hemofilia, as quais serão aprovadas pelo Comitê de Ética.

( ) NÃO: não autorizo armazenar meu material genético após este exame.

Eu, \_\_\_\_\_ (ou meu responsável legal), abaixo assinado estou ciente dos termos acima descritos e concordo com a minha participação no estudo.

.....

assinatura do paciente ou responsável legal

Eu expliquei a \_\_\_\_\_ os objetivos e procedimentos necessários para esta pesquisa, na minha melhor capacidade.

Nome do entrevistador: \_\_\_\_\_

Assinatura do entrevistador: \_\_\_\_\_

Nome da Testemunha: \_\_\_\_\_

Assinatura da testemunha: \_\_\_\_\_

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.