

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**ESTUDO DE DUAS INVERSÕES (INV1 E INV22) DO GENE DO FATOR VIII  
DA COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA EM HEMOFÍLICOS A.**

LEONARDO BARBOSA LEIRIA

Trabalho apresentado como requisito para  
obtenção do grau de Bacharel no Curso de  
Ciências Biológicas, Ênfase Molecular, Celular  
e Funcional.

Orientadora: Eliane Bandinelli

Co-orientador: Dr. Israel Roisenberg

PORTO ALEGRE, 2005

BIO  
BIO  
345

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 O FATOR VIII .....	2
1.2 A HEMOFILIA A E AS SUAS COMPLICAÇÕES .....	5
1.2.1 INIBIDORES CONTRA FATOR VIII .....	7
1.3 MUTAÇÕES NO GENE DO FVIII .....	9
1.4 A INVERSÃO DO INTRON 22 .....	12
1.5 A INVERSÃO DO INTRON 1 .....	15
1.6 OBJETIVOS .....	16
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	16
2.1 A AMOSTRA .....	16
2.2 METODOLOGIA .....	17
2.3 TRIAGEM DOS PACIENTES: TEMPO DE PROTROMBINA E TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADO .....	18
2.4 DOSAGEM DO FATOR VIII E DOSAGEM DE INIBIDOR .....	18
2.5 GENOTIPAGEM DO INTRON 22 .....	20
2.6 GENOTIPAGEM DO INTRON 1 .....	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23
4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS .....	28
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

FVIII	Fator Oito da Cascata de Coagulação Sangüínea
HA	Hemofilia do tipo A
Int1	Intron 1
Int22	Intron 22
Inv1	Inversão do Intron 1
Inv22	Inversão do Intron 22
kD	Kilo Daltons
LD-PCR	<i>Long Distance PCR</i>
pb	Pares de base
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
S-PCR	<i>LD-subcycling PCR</i>
TP	Tempo de Protrombina
TTPA	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado

## AGRADECIMENTOS

Aos orientadores Eliane Bandinelli e Israel Roisenberg;

Ao Dr. Mauro Figueiredo e Dr.<sup>a</sup> Kozue Miyashiro - Instituto FLEURY/SP;

Aos integrantes do Laboratório de Hemostasia;

Aos meus pais e familiares;

Aos meus grandes amigos;

## 1. INTRODUÇÃO

Uma das principais funções do sangue é manter constante o ambiente interno do corpo de forma que os processos fisiológicos possam ocorrer normalmente. A fim de manter essa estabilidade, o sangue tem que permanecer líquido dentro do sistema circulatório. No caso de ocorrer um extravasamento de sangue ou do sangue não permanecer fluído, surgem certas modificações que estancam a hemorragia ou atuam na fluidez do sangue. Esse conjunto de mudanças fisiológicas é conhecido como hemostasia. (ORTHO DIAGNOSTICS INC,1979; TUDDENHAM *et al.*, 1994a).

O processo de hemostasia é um mecanismo vital de defesa contra a perda de sangue. Dele dependem a formação do coágulo (coagulação) e a sua degradação (fibrinólise). A defesa contra a perda anormal de sangue envolve: (1) constrição e retração dos vasos sangüíneos; (2) aglutinação e agregação plaquetárias; (3) coagulação do plasma (TUDDENHAM *et al.*, 1994b).

O caráter essencial do processo de coagulação é que uma proteína circulante, solúvel no plasma, o fibrinogênio, se transforma em fibrina, o coágulo sólido (ORTHO DIAGNOSTICS INC,1979; TUDDENHAM *et al.*, 1994b).

De acordo com os pontos de vista clássicos da coagulação, este é o evento final após duas seqüências de reações principais: (1) a conversão da protrombina em trombina através da ação da tromboplastina e dos íons de cálcio; (2) a transformação do fibrinogênio em fibrina sob a influência da trombina, sendo envolvidas várias etapas e a ativação de vários fatores de coagulação em cada uma das reações (ORTHO DIAGNOSTICS INC,1979; TUDDENHAM *et al.*, 1994a). Como esses fatores de coagulação são interdependentes na formação de um coágulo, a deficiência de um ou mais fatores pode

resultar em uma resposta hemostática anormal, podendo levar à hemorragias ou à formação de trombose.

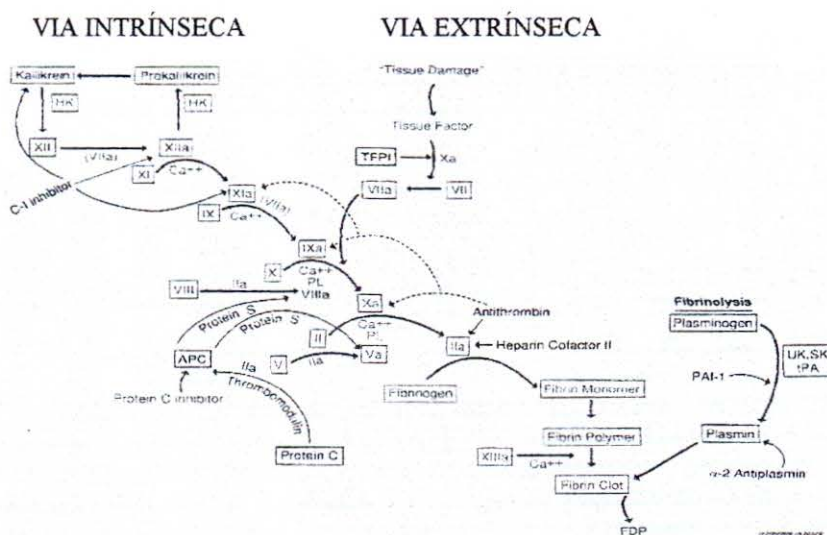
### 1.1 O FATOR VIII

O Fator VIII (FVIII) (fig. 01) é uma glicoproteína que serve como cofator para o fator IXa (serino protease) na conversão do fator X em fator Xa na via intrínseca da coagulação. Após, o fator Xa ativa a protrombina (fator II) em trombina (fator IIa), que cliva o fibrinogênio em fibrina, formando o coágulo (fig. 02). O FVIII é identificado no plasma pela sua atividade pró-coagulante (FVIII:C) ou pela atividade antigênica (FVIII:Ag).



**Fig. 01. Estrutura Molecular do FVIII.** Em roxo os principais motivos alterados em hemofílicos A graves. Retirado de: Escola de Medicina– Universidade de Washington, 1999.

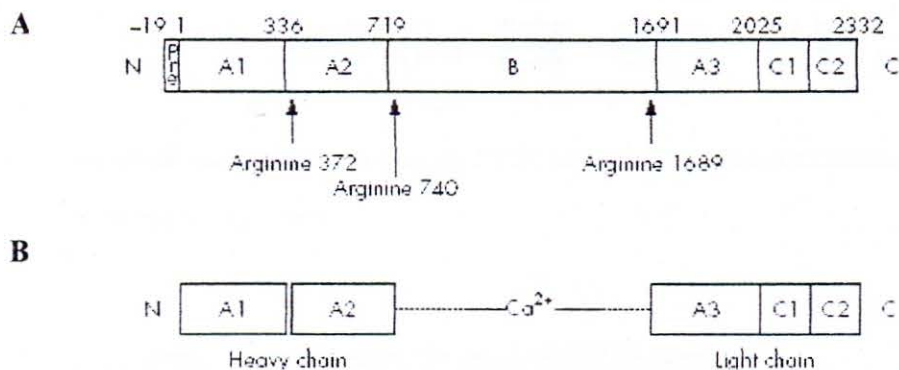
O RNA mensageiro (RNAm) do fator VIII compreende cerca de 9.010 nucleotídeos que codificam um polipeptídeo precursor de 2.351 aminoácidos. Após o processamento do peptídeo sinal (19 aminoácidos), origina-se uma proteína madura de 2.332 aminoácidos (VEHAR *et al.*, 1984).



**Fig. 02. Cascata da Coagulação Sanguínea.** Representação da Via Extrínseca e Intrínseca da Coagulação. Em roxo a via Fibrinolítica e em preto a atuação dos Inibidores da Rota da Coagulação.

Baseado na análise de seqüências de nucleotídeos e aminoácidos, observou-se a existência de regiões de homologia interna no FVIII, sendo estabelecidos 3 domínios estruturais diferentes, denominados, A, B e C, abreviados como NH<sub>2</sub>-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH (VEHAR *et al.*, 1984).

O FVIII é ativado por proteólise, catalisada pela trombina (FIIa), onde os principais sítios de clivagem para a ativação encontram-se na região C-terminal dos resíduos de arginina nas posições 372, 740 e 1689 (fig. 03) (TUDDENHAM, 1994a). A partir dessa clivagem, ocorre a liberação do domínio B, e a formação do FVIIIa a partir da ligação com o Ca<sup>+2</sup> (fig. 03).

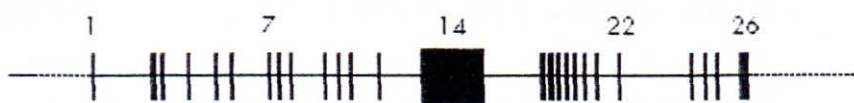


**Fig. 03. Domínios estruturais de ativação do FVIII.** Baseado em BOWEN *et al.*, 2002. N, região aminoterminal; C, região carboxiterminal; (A) FVIII sintetizado contendo a pré-sequência de 19 aminoácidos (peptídeo sinal) e o peptídeo maduro de 2332 aminoácidos (2351 aminoácidos). A1, A2, A3, B, C1 e C2 representam os domínios de homologia. Os resíduos de Arginina são os sítios de ativação e clivagem pela protrombina. (B) FVIII ativado. Os dois domínios (A e C) correspondendo a cadeia leve e pesada, ligados pelo cálcio divalente.

A estabilidade do FVIII depende da interação não-covalente com o fator von Willebrand, que também atua na adesão e agregação plaquetárias. De acordo com SALDER (1998), tal interação, além de promover a estabilidade do FVIII, aumenta a sobrevivência do FVIII circulante, já que confere uma proteção contra a degradação proteolítica na circulação sanguínea, bem como a inibição da neutralização do FVIII por anticorpos (JACQUEMIN & SAINT-REMY, 1998).

O gene do fator VIII tem cerca de 186 kb, é composto por 26 éxons (Fig. 04; Tabela 1) e está localizado no cromossomo Xq28 (GITSCHIER *et al.*, 1984; PEAKE, 1995). Os íntrons representam cerca de 95% do gene (177kb), enquanto que os éxons 5% (9kb) (GITSHIER e *cols.*, 1984; TOOLE e *cols.*, 1984). A proteína madura foi isolada e purificada por FAY *et al.* (1982) e sua estrutura primária foi primeiramente descrita em 1984 (GITSCHIER e *cols.*, 1984; VEHAR *et al.*, 1984).





**Fig. 04. Organização Física do gene do FVIII humano.** As barras representam os éxons do gene. Baseado em GITSCHIER *et al*, 1984.

Tabela 1. Organização do gene do FVIII humano.

Exon	Tamanho (pb)	Intron	Tamanho (kb)
1	313	1	22.9
2	122	2	2.6
3	123	3	3.9
4	213	4	5.4
5	69	5	2.4
6	117	6	14.2
7	222	7	2.6
8	262	8	0.3
9	172	9	4.8
10	94	10	3.8
11	215	11	2.8
12	151	12	6.3
13	210	13	16.0
14	3106	14	22.7
15	154	15	1.3
16	213	16	0.3
17	229	17	0.2
18	183	18	1.8
19	117	19	0.6
20	72	20	1.6
21	86	21	3.4
22	156	22	32.4
23	145	23	1.4
24	149	24	1.0
25	177	25	22.4
26	1958		

Baseado em GITSCHIER *et al.*, 1984.

## 1.2 A HEMOFILIA A E AS SUAS COMPLICAÇÕES

O termo hemofilia foi descrito inicialmente por SCHÖLEIN em 1820, sendo o seu reconhecimento em dois tipos sugerido por PAVLOVSKY (1947) e a distinção entre

hemofilia A e B por três grupos independentes: AGGELER *et al.*, 1952, BIGGS *et al.*, 1952 e SCHULMAN & SMITH, 1952 (DA COSTA, 2004).

A hemofilia A é uma das doenças hemorrágicas mais comuns da via intrínseca da cascata de coagulação sangüínea. Ela é causada pela redução da atividade do fator VIII da coagulação (FVIII), devido a alterações no gene (GITSCHIER *et al.*, 1984; LANDER *et al.*, 2001). O padrão de herança é recessivo ligado ao X, e afeta, aproximadamente, 1 em cada 5000 nascimentos (HOYER, 1994 *apud* SOARES *et al.*, 2001). No Rio Grande do Sul, a prevalência estimada é de 1:11.700 homens (ALEXANDRE & ROISENBERG, 1985).

Nos testes de triagem da cascata de coagulação, o hemofílico A apresenta o tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA) alterado, enquanto que o tempo de protrombina (TP) e o tempo de trombina (TT) apresentam valores normais.

Os pacientes podem ser classificados em três grupos (grave, moderado e benigno) de acordo com as características clínicas apresentadas e a dosagem do fator VIII no plasma (FVIII:C).

A classificação mais recente, quanto à atividade do fator VIII, estabelece que os graves apresentam <1%, moderados de 1 a 5% e benignos de 5 a 50% (FORBES & MADHOK, 1991; GITSCHIER, 1991).

Os hemofílicos graves apresentam sangramentos espontâneos freqüentes ou após traumas leves; os moderados apresentam sangramentos importantes, após pequenos traumas, enquanto que os benignos apenas manifestam a doença após traumatismos fortes ou em intervenções cirúrgicas.

Cerca de 50% dos indivíduos afetados são hemofílicos graves (TUDDENHAM, 1994; ANTONARAKIS *et al.*, 1995; BOWEN *et al.*, 2003), apresentando menos de 1% de atividade coagulante de fator VIII no plasma. A ocorrência nos moderados e benignos é aproximadamente 30% e 20%, respectivamente (ANTONARAKIS *et al.*, 1995).

Os sintomas clínicos mais comuns nos hemofílicos são o aparecimento de hematomas e equimoses. Além disso, os hemofílicos graves podem apresentar sangramentos espontâneos ou traumáticos nos músculos e nas articulações dos joelhos, dos cotovelos e dos tornozelos (hemartroses) (GILBERT, 1981).

O tratamento baseia-se na administração de fator VIII utilizando-se uma variedade de preparações derivadas de plasma humano ou de técnicas recombinantes. A terapia de substituição é efetiva na maioria dos casos, porém, 7 a 30% de indivíduos tratados desenvolvem anticorpos que neutralizam o FVIII e diminuem sua efetividade, denominados de inibidores do FVIII (LUSHER *et al.*, 1993; RIEGER, 1996).

### 1.2.1 INIBIDORES CONTRA O FATOR VIII

Uma das complicações mais sérias no tratamento de hemofílicos é o desenvolvimento de anticorpos (inibidor) contra o FVIII, cuja ampla maioria é pertencente à classe IgG (RIEGER, 1996), que leva à diminuição da qualidade e expectativa de vida dos pacientes (SCANDELLA, *et al.*, 1993). A incidência de inibidor 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).

Alguns trabalhos mostram que hemofílicos portando mutações no gene do FVIII, dentre elas, inversões e translocações, podem apresentar o desenvolvimento de inibidor

(LJUNG *et al.*, 1992; NILSSON, 1993; HOYER, 1995; TUDDENHAM, 1998; BOWEN, 2002) & ASTERMARK *et al.*, 2005). Além disso, a produção de inibidor pode variar conforme a idade, a origem étnica, a dose administrada, a frequência de exposição e a atividade do produto (ASTERMARK *et al.*, 2005; PENNER, 2001; NILSSON, 1993).

Inibidores contra o FVIII são classificados em tipo I ou de alta resposta e tipo II ou de baixa resposta. Inibidores do tipo I são anticorpos que inibem completamente o fator VIII devido à alta afinidade, ligação tempo-dependente (dependência de dose), e normalmente apresenta uma ligação irreversível que segue uma cinética de segunda ordem. (ALY, *et al.*, 1992).

Títulos do inibidor de tipo I exibem uma resposta anamnésica ativa depois de infusões repetidas com concentrados de fator VIII, normalmente alto e sendo detectadas suas concentrações durante meses e até anos (ALY *et al.*, 1992).

Inibidores do tipo II não inibem completamente a função do FVIII, não apresentando resposta ou uma resposta anamnésica mínima, com um baixo título e baixa afinidade, com um tempo independente da dose e reversível, além disso, seguem uma cinética de reação de múltiplas fases (multifásica). Hemofílicos comumente apresentam inibidores do tipo I, enquanto que não-hemofílicos apresentam predominantemente o tipo II (NILSSON, 1988; ALY, *et al.*, 1992) e podem apresentar uma desordem adquirida semelhante à hemofilia A (ZIMMERMAN *et al.*, 1971; NILSSON & LAMME, 1980; NILSSON, 1994).

GAWRYL e HOYER (1982) estudaram a inativação do FVIII nos dois tipos diferentes de inibidor e sugerem que inibidores do tipo I e tipo II interagem com diferentes determinantes antigênicos do FVIII. Inibidores do tipo I interagem próximos ao sítio da atividade pró-coagulante, enquanto que os tipos II interagem com o determinante próximo

ao sítio de ligação do FVIII com o fator von Willebrand (FvW). Neste caso, o impedimento estérico explicaria a maneira de inativação do FVIII:C pelos inibidores do tipo II (GARYL e HOYER, 1982; HOYER *et al.*, 1984).

Doenças autoimunes, como artrite reumatóide, Síndrome do Lúpus Eritromatóide e polimiosites; malignidades; doença inflamatória do intestino e certas inflamações cutâneas estão associadas com inibidores do tipo II. (ALY, 1992; NILSSON, 1994; FAY *et al.*, 1999; GIL, *et al.*, 1999).

ALGIMAN *et al.* (1992), estudando doadores de sangue saudáveis, verificaram que 17% apresentaram inibidor. Apesar dos anticorpos detectados serem do tipo IgG e apresentarem atividade neutralizante contra o FVIII, os níveis médios de atividade do FVIII não diferiram significativamente entre os grupos com e sem inibidor. Outra observação interessante é o fato das amostras com inibidor neutralizarem a atividade coagulante do fator VIII em 'pools' de plasmas normais, mas não neutralizarem o FVIII da própria amostra, sugerindo que os anticorpos naturais desenvolvidos contra o FVIII em indivíduos saudáveis são policlonais e podem estar dirigidos contra diferentes epitopos que representam um polimorfismo não identificado no FVIII.

Mais recentemente, MONDORF *et al.* (1994), investigando a presença de anticorpos através de uma técnica imunoenzimática (ELISA), encontraram que 5,43% dos indivíduos com níveis de FVIII normais apresentaram anticorpos contra o FVIII, sugerindo que os anticorpos presentes nesses indivíduos não apresentavam atividade inibidora.

### 1.3 MUTAÇÕES NO GENE DO FVIII

Estudos moleculares demonstram que mutações de ponto, deleções, inserções no gene do FVIII são freqüentemente encontradas em hemofílicos. Mutações de ponto são os defeitos genéticos mais comuns em hemofilia, correspondendo a mais da metade dos casos, seguidos pelas deleções e pelos casos de inserções e rearranjos/inversões. Em pacientes com hemofilia A, as inversões no gene do FVIII são responsáveis por 20% de todos os casos dessa doença, sendo que em hemofílicos benignos e moderados são eventos muito raros e em hemofílicos graves apresentam uma alta prevalência, sobretudo, a inversão do intron 22 (ANTONARAKIS *et al.*, 1995; BOWEN, 2002).

Em uma revisão e estudo de meta-análise, ANTONARAKIS *et al.* (1995) investigaram mutações no gene do FVIII em 1000 pacientes não consangüíneos. Os resultados foram: 46% dos hemofílicos graves apresentaram mutações de ponto, 42% inversões, 8% deleções, e 4% não apresentaram nenhuma dessas mutações. No mesmo estudo, 91% dos hemofílicos benignos apresentaram mutações de ponto e em 9% não foram encontradas mutações. Dentre as mutações de ponto estavam incluídas: mutações “missense” (53%); “CpG-para-TpG” (16%); pequenas deleções (12%); mutações “nonsense” (9%); pequenas inversões (3%); mutações em sítios de “splicing” (3%); polimorfismos “missense” (2%); mutações silenciosas em exons (2%) e inserções (1%).

Esses resultados estão de acordo com os descritos por BAGNALL *et al.* (1998, 2002 e 2005a), que estudaram as inversões do intron 1 e 22 em 209 pacientes, onde 45% dos hemofílicos graves apresentavam a inversão do intron 22; 3% a inversão do intron 1; 40% apresentavam rearranjos; deleções e mudanças na fase de leitura; mutações “nonsense” ou de “splicing” e 10% mutações “missense”. Quanto aos hemofílicos benignos e moderados,

97% apresentavam rearranjos, deleções, mudanças na fase de leitura, mutações nonsense ou de “splicing” e 1% possuía mutações “missense” e nenhum apresentou as inversões do intron 1 ou 22.

Em um estudo com 113 famílias européias contendo 231 hemofílicos A grave, 74 famílias apresentavam a inversão do intron 22; 14 famílias portavam mutações “nonsense”; 9 famílias com mutações “missense”; 9 com pequenas deleções ou inserções; 4 famílias com grandes deleções no gene do FVIII e 3 famílias com mutações em sítios de “splicing” (ASTERMARK *et al.*, 2005).

Quanto à relação entre a taxa de mutação e outros fatores, HERMANN (1966) demonstrou o efeito da idade na taxa de mutação em hemofilia, porém, BARRAI *et al.* (1968) não encontraram tal relação com o efeito da idade materna ou da idade do avô materno (ao nascimento da mãe do paciente).

VOGEL (1977) foi o primeiro a concluir que a taxa de mutação que causa hemofilia A é mais alta em homens que em mulheres e atualmente a taxa de mutação dos homens é calculada como sendo 5,2 vezes a encontrada em mulheres (BROCKER-VRIENDS *et al.*, 1991). Do mesmo modo, estudando somente hemofílicos graves, ROSENDAAL *et al.* (1990) apresentou que a relação das frequências de mutação em homens e mulheres eram de 2.1.

Até o momento, 943 mutações foram encontradas em hemofílicos, sendo 270 mutações descritas em hemofílicos graves, ( NCBI, HAMSTERS), demonstrando a alta heterogeneidade alélica na hemofilia A. Essa variabilidade genética poderia dificultar no rápido diagnóstico de hemofílicos e, principalmente, de heterozigotas, a partir da utilização das técnicas de detecção molecular.

O estudo e a caracterização de heterozigotas e o diagnóstico pré-natal podem ser utilizados tanto para a detecção direta de mutações mais frequentes nas populações (especialmente as inversões nos hemofílicos graves), como também indiretamente através de análise de estudos de ligação (ASTERMARK *et al.*, 2005). Dentre essas é importante destacar a inversão do intron 22 (Inv22) e a Inversão do Intron 1 (Inv1) (BOWEN *et al.* 2003; ASTERMARK, *et al.*, 2005).

#### 1.4 A INVERSÃO DO INTRON 22

PATTERSON *et al.* (1989) mostraram que seqüências do genoma são reconhecidas por uma mesma sonda em duas regiões do cromossomo X (Xq28). Uma região dentro do intron 22 do gene do fator VIII e outra localizada a 1.2 kb do gene.

LEVINSON *et al.* (1990a) procurando transcritos na região Xq28, encontraram uma região denominada de A (F8A) que hibridizava com uma região do exon 22 do gene do fator VIII. A F8A estava em orientação inversa à região do gene e continha uma região homóloga ao intron 22. Análises computacionais sugeriam que se tratava de uma região codificadora e o cDNA da F8A também apresentava um bom grau de similaridade em ratos, camundongos e macacos (LEVINSON *et al.*, 1990b).

Outros trabalhos demonstraram que mutações envolvendo regiões do intron 22 levavam a um acoplamento defeituoso dos exons 22 e 23 no RNAm sendo a causa de hemofilia A grave em pacientes afetados no Reino Unido, tendo como conseqüências futuras que mutações fora do gene do FVIII não estariam associadas com a hemofilia A na forma grave (NAYLOR *et al.*, 1991; NAYLOR *et al.*, 1992).

O cromossomo X contém 3 cópias de F8A e suas regiões adjacentes, sendo uma no intron 22, denominada de Int22h1 e duas cópias adicionais na região telomérica *upstream*



(à montante), aproximadamente 500kb, ao códon de início do gene do fator VIII (Int22h2 e Int22h3) (FREIJE & SCHLESSINGER (1992). O intron 22 encontra-se numa região de 32 kb e contém uma ilha de CpG, aproximadamente 10 kb *downstream* (à jusante) do exon 22. Esta ilha parece servir como um promotor bidirecional para os Int22h2 e Int22h3, ambos transcritos na direção oposta ao fator VIII (Int22h1) (LAKICH *et al.*, 1993).

Muitas das mutações no FVIII que causam a hemofilia A grave são resultantes da recombinação entre as sucessivas F8A homólogas dentro do intron 22 *upstream* ao gene. Tal recombinação conduziria a uma inversão das seqüências de DNA e à formação de um códon de parada. LAKICH *et al.* (1993) apresentaram evidência para apoiar este modelo e descreveram uma técnica de *Southern blot* para detectar esse tipo de inversão, onde 45% dos hemofílicos graves estudados apresentaram a inversão. Estes autores também sugeriram que se formava um RNA mensageiro híbrido entre as regiões dos exons 1-22 do fator VIII e que as inversões que envolvem o intron 22 são a base dos defeitos no RNAm. Estas mutações em pacientes gravemente afetados acontecem à taxa de aproximadamente  $4 \times 10^{-6}$  por gene/por gameta/por geração.

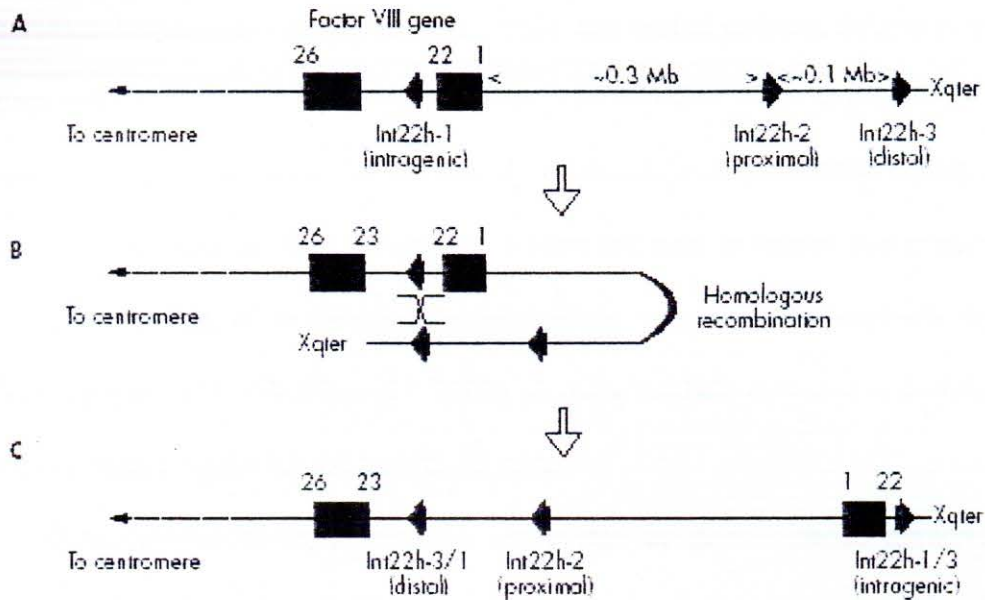
OLDENBURG *et al.* (2000) demonstraram que a Inv22 pode se apresentar como um mosaicismismo somático e que a inversão não é restrita a divisões celulares meióticas mas também pode acontecer durante divisões mitóticas, ou em precursores das células germinativas ou de células somáticas.

Além disso, o emparelhamento do Xq com seu homólogo inibe a inversão intracromossomal do intron 22 e esse evento de inversão ocorreria predominantemente em células germinativas masculinas, com uma relação de 3:1 (ROSSITER *et al.* 1994; OLDENBURG *et al.*, 2000; LEUER *et al.*, 2001).

A Inv 22 é originada de uma recombinação homóloga intracromossomal entre uma região de 9,5 Kb do intron 22 (Int22h1) e uma região homóloga extra-gênica de cópia invertida, proximal (Int22h2) ou distal (Int22h3) do gene (Fig.05) (LACKICH, *et al.*, 1993; NAYLOR *et al.*, 1995).

Portanto, torna-se interessante o estudo da Inv22 em hemofílicos graves, devido a sua alta frequência, cerca de 42% dos casos graves da população mundial, não tendo registros dessa inversão em hemofílicos com formas moderadas ou leves. (ROSSETTI *et al.*, 2004a).

Sabendo disso, e como a técnica de *Southern blotting* apesar de ser eficiente, se torna muito demorada e trabalhosa, principalmente, quanto aos cuidados e dificuldades em se trabalhar com material radioativo, LIU *et al.* (1998) desenvolveram uma técnica de *LD-subcycling* (S-PCR) que se baseia na amplificação de fragmentos maiores de 10 Kb, LD-PCR (*Long-distance PCR*), a partir de ciclos múltiplos de anelamento e extensão (*subcycling*).



**Fig. 05. Mecanismo hipotético da Inv22.** Baseado em BOWEN *et al.*, 2002. As setas representam o sentido da transcrição. (A) Região representada antes da inversão ou de indivíduos sem a Inv22. (B) Recombinação homóloga intracromossomal, podendo ser distal ou proximal. (representação da recombinação distal). (C) Linearização da Inv22 e a interrupção no gene do FVIII. Exons 1 a 22 apresentam orientação invertida levando à produção de um transcrito defeituoso e de um FVIII truncado.

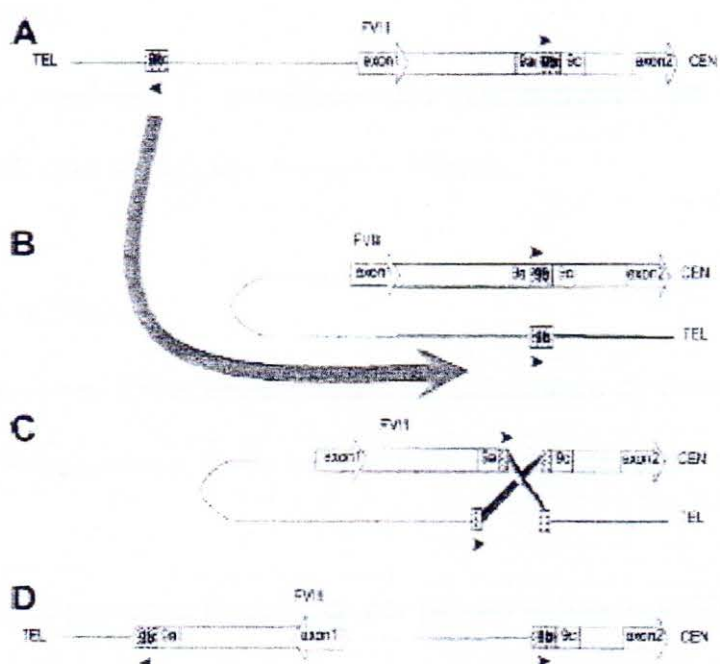
## 1.6 A INVERSÃO DO INTRON 1

A inversão do intron 1 (Inv1) é a segunda inversão mais freqüente descrita na literatura, ocorrendo em cerca de 5% dos casos de hemofilia A grave da população mundial, também causada por uma recombinação homóloga intracromossomal (BAGNALL *et al.*, 2002; TIZZANO *et al.*, 2003).

Os primeiros relatos dessa inversão foram descritos por BRINKE *et al.* (1996), onde pacientes hemofílicos mostraram uma inversão que alterava o primeiro intron do FVIII e deslocava a maior parte do exon 1 (100 kb) em direção ao telômero. Essa inversão era

causada por um rearranjo cromossômico que envolvia uma recombinação homóloga intracromossômica (KENWRICK *et al.*, 1992). Em outros estudos, BRINKE *et al.* (1996) notaram que a Inv1 cria 2 unidades de transcrição híbridas. Uma seqüência de 1041 pares de base do intron 1 (*Int1h-1*) foi encontrada duplicada e de orientação oposta (*Int1h-2*) a cerca de 140 kb fora do gene. O *Int1h-1* é formado pelo promotor e o primeiro exon do fator VIII e expressa as seqüências que estão entre uma região denominada de C6.1A e a região telomérica (TIZZANO *et al.*, 2003). A outra unidade de transcrição híbrida contém ilhas CpG, toda a região C6.1A e parte do gene.

O mecanismo da Inv1 envolve um evento de recombinação intracromossômica, entre a seqüência homóloga *Int1h-1* localizada no exon e a seqüência *Int1h-2* localizada a 100 kb da região 5' do gene (fig. 06) (BAGNALL *et al.*, 2002), levando à produção de uma proteína truncada, um FVIII não funcional (ACQUILA *et al.*, 2003).



**Fig. 06. Mecanismo hipotético da Inv1.** Baseado em BAGNALL *et al.*, 2002, com modificações. (A) As barras mostram o intron 1 flanqueado pelos exons, as setas indicam o sentido da transcrição, contendo a

seqüência repetida 9b flanqueada por uma seqüência única 9a ou 9c. Fora do gene uma seqüência homóloga ao 9b. (B, C) A recombinação homóloga entre as seqüências 9b originando a inversão. (D) Resultado da inversão do intron 1, gerando as regiões 9ab, 9ac e 9bc.

## 1.6 OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho é identificar inversões do intron 1 e do intron 22 em pacientes com hemofilia A grave no Rio Grande do Sul e verificar a ocorrência de inibidor nos pacientes portadores dessas inversões. Para se genotipar essas inversões foi necessário padronizar as técnicas da S-PCR para o estudo da Inv22 e da PCR simplex para o estudo da Inv1.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 A AMOSTRA

Foram estudados 31 hemofílicos não consangüíneos com dosagem de fator VIII menor que 1%, com idades entre 6 meses e 39 anos.

### 2.2 METODOLOGIA

Os pacientes foram encaminhados ao Laboratório de Hemostasia conforme o seu histórico de sangramentos, foram entrevistados e coletados cerca de 5 a 10 ml de sangue periférico.

O sangue periférico foi coletado por punção venosa, centrifugado e com a fração de menor densidade (o plasma) foram realizados os testes de triagem: Tempo de Protrombina (TP), Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA), dosagem do fator VIII da

coagulação (AUSTEN & RHYMES, 1975) e dosagem de inibidor contra o FVIII (KASPER *et cols.*, 1975).

A extração de DNA dos pacientes foi realizada pelo método de *salting out* (LAHIRI & NURNBERG JR, 1991; MILLER *at al.*, 1988) e/ou fenol-clorofórmio (SAMBROCK *et al.*, 1998).

A quantidade e a qualidade de DNA foram determinadas por espectrofotometria nos comprimentos de onda 260, 280 e 230 nm (SAMBROCK *et al.*, 1998).

A genotipagem dos pacientes para as inversões do intron 22 e do intron 1 foram realizadas por PCR e os fragmentos amplificados foram separados em um gel de agarose 0,6% (p/v) e 1% (p/v) respectivamente, contendo brometo de etídeo e visualizados em presença de luz Ultra Violeta.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste de Fisher e Chi-quadrado( $\chi^2$ ) no programa BioEstat 2.0.

### 2.3 TRIAGEM DOS PACIENTES: TEMPO DE PROTROMBINA E TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADO

Os testes de triagem servem para verificar a eficiência das vias extrínseca (TP) e intrínseca (TTPA) da cascata de coagulação sanguínea (AUSTEN & RHYMES, 1975). O teste de protrombina (TP) avalia a eficiência da via extrínseca em formar a rede de fibrina (coágulo) em presença de tromboplastina e cálcio. O índice do paciente é calculado pela razão entre o tempo de formação do coágulo na amostra do paciente e o tempo do controle. A ausência ou os níveis mais baixos de um dos fatores da via extrínseca levam a índices

maiores e tempos mais elevados de coagulação. Em hemofílicos A o teste de protrombina apresenta um resultado normal.

O teste de tromboplastina parcial ativado (TTPA) consiste na avaliação da eficiência do sistema intrínseco na formação da rede de fibrina em presença do fosfolípideo, cálcio e de um ativador do sistema de contato (caulim, ácido elágico ou sílica). O índice do paciente é calculado pela razão entre o tempo de formação do coágulo do paciente e o tempo do controle. Hemofílicos apresentam um TTPA prolongado em relação ao controle.

#### 2.4 DOSAGEM DO FATOR VIII E DOSAGEM DE INIBIDOR

A dosagem do FVIII (FVIII:C) se baseia na geração de trombina e formação da rede de fibrina (coágulo) pela realização de um teste de TTPA na presença de um substrato (plasma deficiente de fator VIII). O tempo de coagulação é diretamente proporcional à concentração plasmática do FVIII presente na amostra. A dosagem do nível de FVIII dos pacientes é obtida a partir de uma curva de referência dilogarítmica de diluições seriadas de um plasma normal comercial (atividade x tempo de coagulação).

A dosagem de inibidor foi desenvolvida por KASPER e *cols.* (1975) e está baseada na capacidade do inibidor neutralizar uma quantidade específica da atividade coagulante do fator VIII em um plasma normal. Uma unidade é definida como a atividade em um mililitro de plasma, o qual quando misturado com um igual volume de plasma normal por 2 horas a 37°C reduz a concentração do FVIII pela metade (KASPER, 1991).

O teste consiste na dosagem do FVII:C de duas misturas. A mistura controle é formada por 1 volume de plasma normal e 1 volume de solução tampão imidazol pH 7,2. A mistura a ser testada é formada por 1 volume de plasma normal e 1 volume de plasma do paciente. Ambas misturas são dosadas após 2 horas à 37°C em relação à atividade

coagulante do FVIII. No caso do plasma teste conter algum inibidor específico para o FVIII, este irá neutralizar o fator VIII do plasma normal da mistura teste e conseqüentemente o resultado da dosagem será menor que o da mistura controle.

## 2.5 GENOTIPAGEM DO INTRON 22

Foram utilizados dois conjuntos de *primers* específicos (PQ e AQ) descritos por LIU *et al.* (1998). O fragmento amplificado a partir dos *primers* PQ apresenta 12 kb e corresponde aos indivíduos sem a inversão e o fragmento amplificado pelos *primers* AQ de 11 kb de tamanho, representa os hemofílicos que apresentam a Inv22 (Fig. 07).

A amplificação dos produtos da S-PCR ocorreu utilizando-se em cada reação 500 ng de DNA genômico de alta qualidade (BOWEN *et al.*, 2003), 0,4 pmol/ $\mu$ l de cada *primer*; 0,5 mM de dCTP, dATP, dTTP; 0,1875 mM de deaza dGTP (37,5%), 0,3125 mM dGTP (62,5%); 0,5 mM de MgSO<sub>4</sub>; 7,5% de DMSO; 2,5 IU/ reação de ELONGASE (Invitrogen) e tampão 1x para a reação (ELONGASE B).

As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 10 ciclos de (desnaturação a 94°C por 30s e 4 ciclos alternados de 60°C e 65°C por 2 min. cada) e 25 ciclos de (desnaturação a 94°C por 30s / 60°C por 2 min. + 3s por ciclo / 65°C por 2 min. + 3s por ciclo / 4 ciclos alternados de 60°C a 65°C por 2 min. cada) e uma extensão final de 10 min.



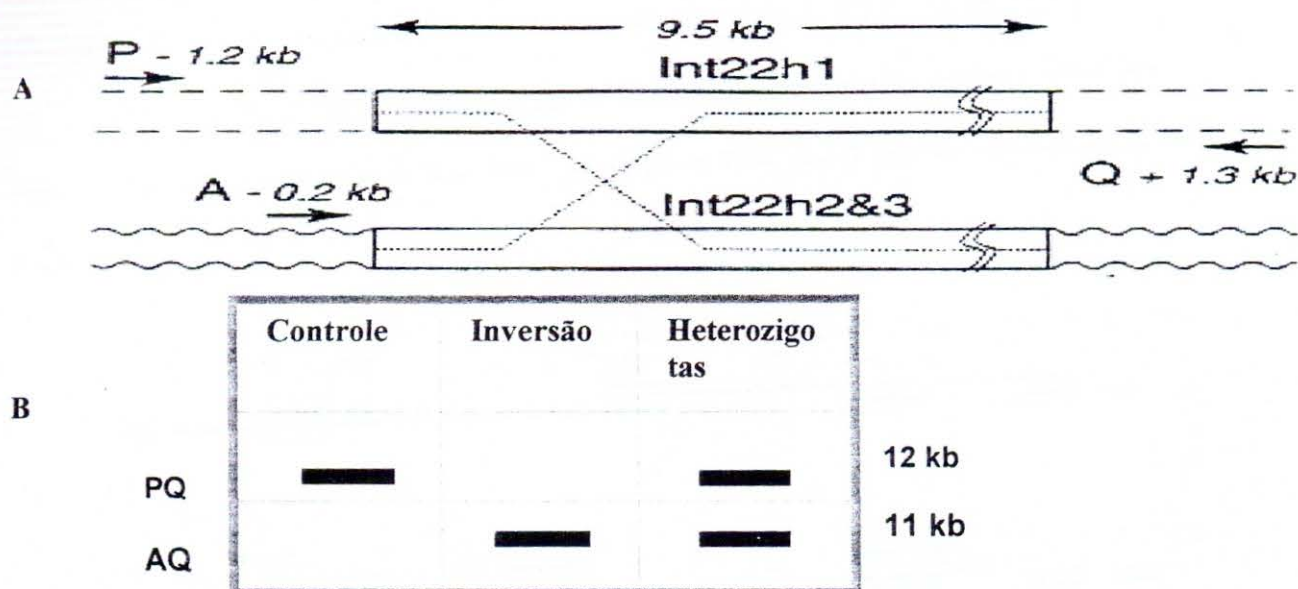


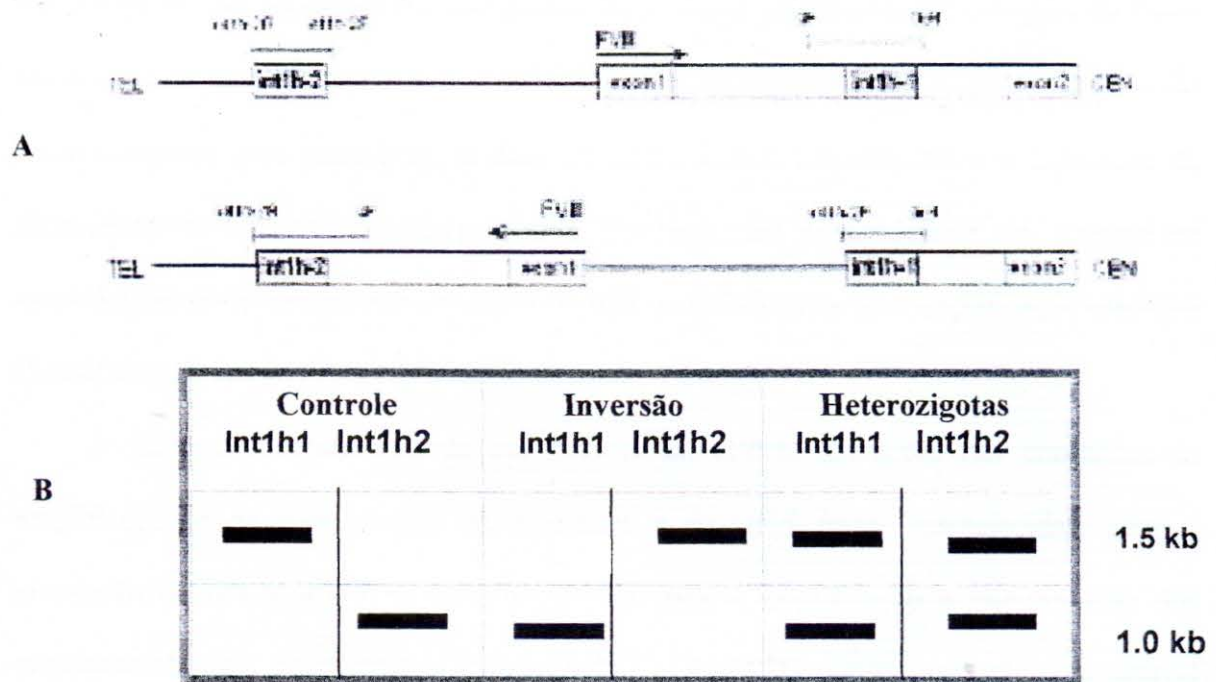
Fig. 07. Esquema da amplificação dos fragmentos da *Inv22* por S-PCR. Baseado em Liu *et al* (1998), com modificações. (A) Amplificação dos fragmentos a partir dos *primers* AQ e PQ. (B) Amplificação de um fragmento com 12 kb nos indivíduos sem a *Inv22* e de um fragmento de 11 kb nas heterozigotas da *Inv22*. O esquema representa a visualização da eletroforese em gel de agarose 0,6%.

## 2.6 GENOTIPAGEM DO INTRON 1

A detecção da *Inv1* foi realizada utilizando-se duas reações de PCR, uma para amplificar a região *Int1h1*, com os *primers* *Inth1-1*, *9cR* e *9F* e outra para amplificar a região *Int1h2*, utilizando os *primers* *Inth1-2f*, *Inth1-2R* e *9F*, descritos por BAGNAL *et al.* (2002). O fragmento amplificado de 1.5 kb na região *Int1h1* e 1.0 kb na região *Int1h2* corresponde aos indivíduos sem a inversão e os fragmentos de 1.0 kb na região *Int1h1* e 1.5 kb na região *Int1h2* representam os hemofílicos que apresentam a *Inv1*(Fig. 08).

A amplificação ocorreu utilizando-se em cada reação 200 ng de DNA genômico, 0,4 pmol/μl de cada *primer*; 0,2 mM de cada dNTP, 1 IU/ reação de Taq DNA polimerase (Cenbiot) e tampão 1x contendo 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-Cl pH 8 e 10 mM KCl.

As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 30 ciclos de (94°C por 30s, 65°C por 2 min e 72°C por 2 min.) e extensão final de 5 min.



**Fig. 08. Esquema da amplificação dos fragmentos da *Inv1* por PCR.** Baseado em BAGNAL *et al*, (2002), com modificações. (A) Amplificação dos fragmentos a partir dos *primers* que amplificam as regiões Int1h1 (Int1h1-1, 9cR e 9F) e Int1h2 ( Int1h1-2f, Int1h1-2R e 9F). Sentido da amplificação nos pacientes sem e com a *Inv1* (acima e abaixo). (B) Amplificação de um fragmento com 1.5 kb na região Int1h1 e 1 kb na região Int1h2 nos indivíduos sem a *Inv1* e de um fragmento de 1 kb na região Int1h1 e 1.5 kb na região Int1h2 nas heterozigotas da *Inv1*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

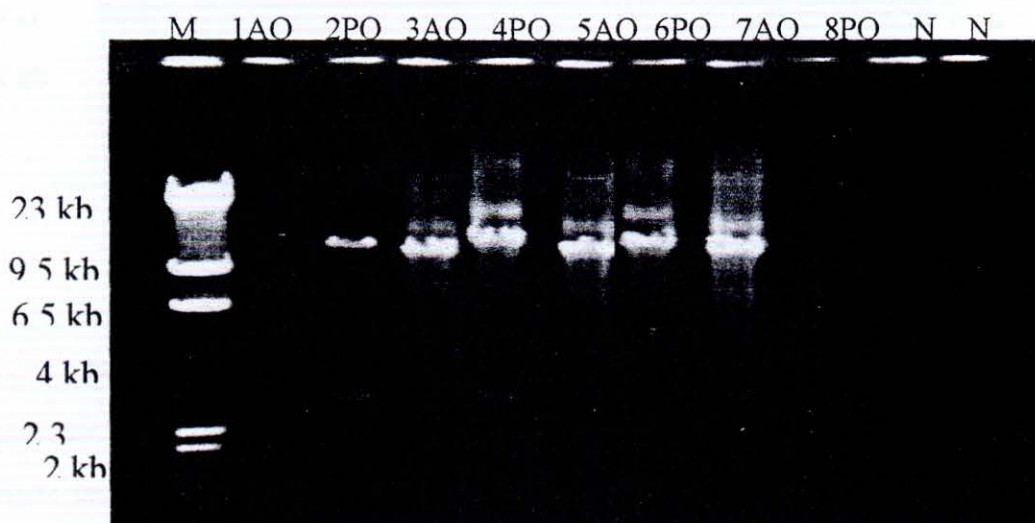
Uma das etapas principais desse trabalho foi a padronização da técnica de S-PCR para a genotipagem do intron 22 nas condições de nosso laboratório. A amplificação de fragmentos maiores que 10 kb apresenta várias dificuldades, além de necessitar cuidados especiais. Dentre os problemas mais comuns estão a dificuldade na desnaturação e separação de regiões muito extensas de DNA dupla-fita; a quantidade e qualidade do DNA; a presença de cátions divalentes que podem atuar como promotores de clivagem de DNA em temperaturas elevadas; a maior dificuldade da incorporação de bases corretas e do reconhecimento pela polimerase; o dano ao DNA após a amplificação e a separação de fragmentos de tamanhos muito próximos. Por isso, faz-se necessário um sistema de amplificação mais complexo e um DNA de alta qualidade para uma amplificação eficiente (SAMBROCK *et al.*, 1998; BOWEN & KELNEY, 2003).

A partir da técnica descrita por LIU *et al.* (1998) alterações nas condições de amplificação e na concentração de reagentes e de DNA foram estabelecidas, onde a proporção de deaza dGTP se mostrou crítica para a amplificação e interpretação dos resultados obtidos. Além disso, a utilização da ELONGASE, por ser mais eficiente, estável e de baixo número de incorporações erradas, foi outro fator importante para a amplificação. A qualidade do DNA em relação à presença de outros compostos orgânicos na solução, foi outro fator decisivo, até mais importante que a quantidade de DNA, que demonstrou nessa técnica poder amplificá-lo nas concentrações de 300 a 500 ng, sendo mais eficiente com quantidades de DNA próximas a 500 ng.

Mesmo com essas dificuldades quanto a qualidade e quantidade de DNA e as condições mais restritas para a amplificação, a técnica de S-PCR é considerada mais rápida

na detecção da Inv22 do que a técnica de *Southern* ( LIU *et al*, 1998; BOWEN & KELNEY, 2003).

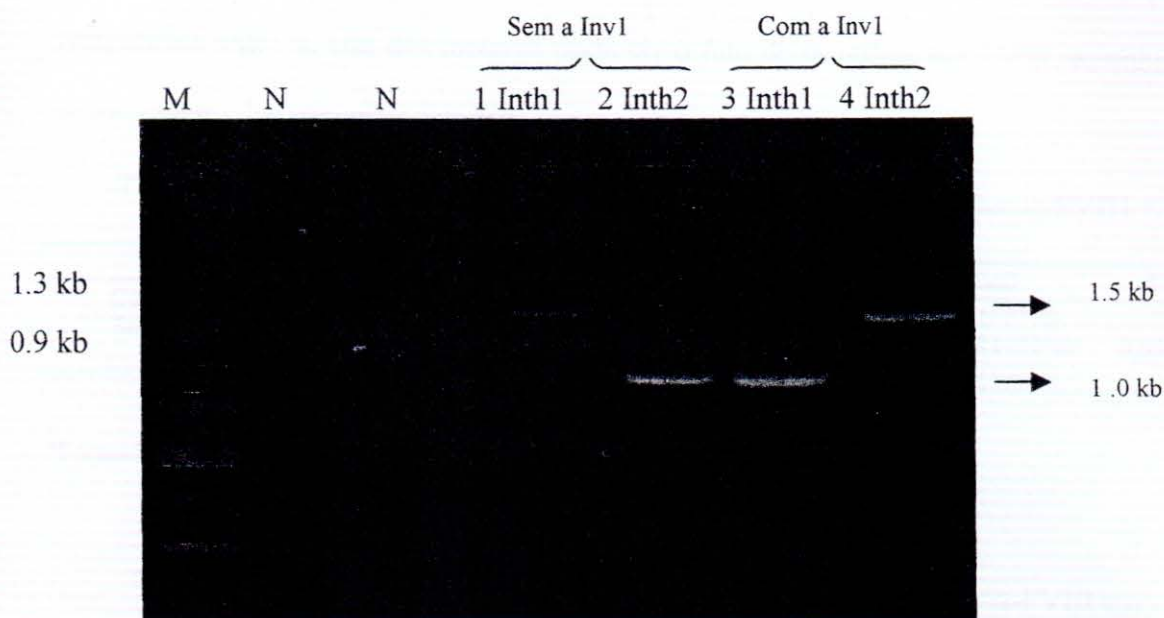
Dos 31 hemofílicos estudados, 11 apresentaram a inversão do intron 22 correspondendo a uma frequência de aproximadamente 36% (Fig. 9.). Esse resultado está de acordo com o observado em populações de outros países, cerca de 42% e com o descrito no Brasil para a Inv22 (39%) por SOARES *et al* (2001) utilizando a técnica de *Southern blot*.



**Fig. 09. Produto da amplificação do Intron 22.** Gel de agarose 0,6%. Canaleta M, marcador de peso molecular DNA  $\lambda$  Digerido c/Hind III; AQ - amplificação *primers* AQ; PQ - amplificação *primers* PQ; Canaletas 1 e 2 paciente sem a inversão; Canaletas 3, 4, 5 e 6 heterozigotas; Canaletas 7 e 8 paciente com a inversão; Canaletas N, controle negativo das reações.

Já a padronização da técnica de PCR pra a detecção da Inv1 foi mais fácil, sobretudo por amplificar fragmentos menores que os da Inv22. Todos os hemofílicos testados para a Inv22 foram testados também para a Inv1, sendo que, apenas 1 paciente apresentou a Inv1,

representando uma frequência de cerca de 3% dos pacientes testados (fig. 10). Da mesma forma, esse resultado está dentro do observado em pesquisas de outros países, sendo que não existem dados publicados de sua frequência no Brasil.



**Fig. 10. Produto da amplificação do Intron 1.** Gel de agarose 1%. Canaleta M, marcador de peso molecular; Int1h1 representa a região amplificada com os *primers* 9cR, 9F e Inth-2F; Int1h2, representa a região amplificada com os *primers* 9F, Int1h-2F e Inth-2R; Canaleta N representa o controle negativo das reações. Canaletas 1 e 2 representam um indivíduo sem a Inv1 (paciente 1); Canaletas 3 e 4 representam um paciente contendo a Inv1 (paciente 2).

Nos pacientes estudados no presente trabalho, a frequência de inibidor nos hemofílicos graves foi de aproximadamente 21%, dos quais 9% possuíam a Inv22 e nenhum apresentava a Inv1. Não foi encontrada associação entre a presença de inibidor e a Inv22,  $P=0,3547$  (Tabela 2). Esses resultados estão de acordo com os dados observados em estudos realizados nas populações do Irã, Polônia e Argentina,  $P=0,6252$  (Tabela 3), porém

quando comparados juntamente com os dados obtidos de estudos das populações da Suécia e Itália, a diferença entre os hemofílicos contendo a Inv22 foi significativa ( $P=0,0019$ ). Nesses estudos com as populações da Suécia e da Itália, também não foi encontrada associação entre a presença da Inv22 e a produção de inibidor, porém esses dados de frequência diferem significativamente de todas as outras populações apresentadas, quando comparadas entre si. Um dos motivos pode ser o fato de se utilizarem FVIII recombinante no tratamento dos pacientes estudados nesses dois países.

Tabela 2. Frequência da presença/ausência da Inv22 e do Inibidor  $\alpha$ -FVIII\*.

	Com Inv22	Sem Inv22	Total	P
Com Inibidor	1/11 ( 9%)	5/17 (~30%)	6/28 (~21%)	<b>0,3547</b>
Sem Inibidor	10/11 (91%)	12/17 (~70%)	22/28 (~79%)	
Total	11	17	28 (100%)	

\*Foram testadas 28 famílias, 11 contendo a inversão e 17 sem a inversão.

Tabela 3. Frequência da presença/ausência da Inv22 e do Inibidor  $\alpha$ -FVIII em diferentes populações.

População	Com a Inv22 e com Inibidor	Com a Inv22 e sem Inibidor	Sem a Inv22 e com Inibidor	Sem a Inv22 e sem inibidor	P	Referência
Suécia	47%	53%	31%	69%	0,1394	ASTERMARK <i>et al.</i> , 2005
Itália	45%	55%	17%	83%	0,0655	TAGARIELLO <i>et al.</i> , 2000.
Argentina	28%	72%	20%	80%	0,6892	DE BRASI <i>et al.</i> , 2000.
Polônia	23%	77%	26%	74%	0,7857	SAWECKA <i>et al.</i> , 2005.
Irã	18%	82%	8%	92%	0,1639	LARI <i>et al.</i> , 2004.
Rio Grande do Sul	9%	91%	30%	70%	0,3547	Presente trabalho

No único paciente contendo a Inv1 não foi encontrada a presença de inibidor contra FVIII. Os resultados dos estudos realizados na Espanha, República Checa, Itália e Índia mostram que não foi encontrada associação entre a presença de inibidor e a Inv1 nos hemofílicos graves. Além disso, esses dados quando comparados entre si, não diferem estatisticamente,  $P=0,1858$  (Tabela 4).

Tabela 4. Frequência da presença/ausência da Inv1 e do Inibidor  $\alpha$ -FVIII em diferentes populações.

População	Com a Inv1 e com Inibidor	Com a Inv1 e sem Inibidor	Sem a Inv1 e com Inibidor	Sem a Inv1 e sem inibidor	P	Referência
Itália	50%	50%	15%	85%	0,1347	ACQUILA <i>et al.</i> , 2003.
Espanha	10%	90%	20%	80%	0,5000	TIZZANO <i>et al.</i> , 2003 e 2005. BAGNALL <i>et al.</i> , 2002.
República Checa	0%	100%	4%	96%	0,7879	HABART <i>et al.</i> , 2003.
Índia	0%	100%	5%	95%	0,8800	AHMED <i>et al.</i> , 2003.

A partir desses resultados então, pode-se concluir que a incidência de inibidor nos hemofílicos graves estudados está de acordo com o descrito para a população brasileira (~20%). A prevalência de inibidor em hemofílicos portadores da Inv22 (9%) foi menor, mas não estatisticamente significativa, quando comparada a outras populações, não sendo um fator de risco para o desenvolvimento de inibidor, pois a frequência de inibidor em

hemofílicos que não apresentam a inversão foi cerca de 30%. Da mesma forma, a ausência de inibidor em hemofílicos graves com a Inv1, demonstra não ser um fator de risco para o seu desenvolvimento, estando de acordo com os estudos e a média em outras populações (5-30%). Esses resultados estão de acordo com a proposta por ANTONARAKIS *et al.* (1995), na qual inversões não parecem ser um fator de predisposição principal para o desenvolvimento de inibidor em hemofílicos graves.

A idade dos hemofílicos estudados, a frequência de exposição ao fator VIII exógeno e o baixo número de famílias estudadas contendo a Inv22 podem ter influenciado nessa menor tendência encontrada nos hemofílicos contendo a inversão (ASTERMARK *et al.*, 2005).

#### CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A técnica de S-PCR se mostrou eficiente na detecção da Inv22 na população de hemofílicos do tipo A severos, apresentando um diagnóstico rápido na detecção dessa inversão. Da mesma forma a amplificação da Inv1 se mostrou eficiente e rápida na detecção dessa mutação.

As frequências encontradas na amostra estudada quanto às duas inversões foram de 36% para a Inv22 e 3% para a Inv1, perfazendo um total de 39% dos hemofílicos graves estudados.

Não foi encontrada associação entre a Inv22 e a produção de inibidor contra o FVIII.

As perspectivas do trabalho são aumentar o número de pacientes hemofílicos estudados e identificar as heterozigotas para a Inv22 e Inv1 para aconselhamento genético.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT. Projeto NBR14724. **Informação e Documentação – Trabalhos Acadêmicos**. Rio de Janeiro, RJ. Agosto de 2002.
- ABNT. Projeto NBR6023. **Referências e Citações Bibliográficas**. Rio de Janeiro, RJ. Agosto de 2002.
- ACQUILA, M., PASINO, M., SANTORO, C., T. LANZA, T., MOLINARI, A. C., BOTTINI, F. & BIOCCHI, M. P. (2003). Germ-line origin of intron 1 inversion in two haemophilia A families. **Haemophilia** 9, 717–720.
- AGGELER, P. M., WHITE, S. C., GLENDENING, M. B., PAGE, E. W., LEAKE, T. B. & BATES, G. (1952). Plasma thromboplastin component (PTC) deficiency: a new disease reembling hemophilia. **Proc. Soc. Exp. Med.**; 70 : 692-694.
- AHMED, R., KANNAN, M., CHOUDHRY, V. P. & SAXENA, R. (2003). Mutation reports: Intron 1 and 22 inversions in Indian haemophilics. **Ann Hematol** 82:546–547.
- ALEXANDRE, C. O. P. & ROISENBERG, I. (1985). Genetic and demographic study of hemophilia in Brazil. **Human Hereditary**; 35 : 250-254.
- ALGIMAN, M., DIETRICH, G., NYDEGGER, U., E., BOIELDIEU, D., SULTAN, Y. & KAZATCHKINE, M. D. (1992). Natural antibodies to factor VIII (anti-hemophilic factor) in healthy individuals. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 89 : 3795-3799.

- ALY, A. M.; HIGUCHI, M.; KASPER, C. K.; KAZAZIAN, H. H., JR.; ANTONARAKIS, S. E.; HOYER, L. W. (1992a). Hemophilia A due to mutations that create new N-glycosylation sites. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89: 4933-4937.
- ALY, A. M.; HOYER, L. W. (1992b). Factor VIII-East Hartford (arginine1689 to cysteine) has procoagulant activity when separated from von Willebrand factor. *J. Clin. Invest.* 89: 1382-1387.
- ANTONARAKIS, S. S., 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.
- ASTERMARK, J., OLDENBURG, J., ESCOBAR, M., WHITE, G. C. & BERNTORP, E. (2005). Genetic defects and inhibitor development in siblings with severe hemophilia A. *Haematologica*; 90 (7) : 924-930.
- AUSTEN, D. E. G. & RHYMES, I. L. (1975). **A laboratory manual of blood coagulation.** Blackwell Scientific Publications. Oxford, New York p.53-55.
- BAGNALL, R. D., WASEEM, N., GREEN, P. M. & GIANNELLI, F. (1998) Mutation analysis and genetic service: the construction and use of national confidential databases of mutations and pedigrees. *Genet Test.* 1 (3) : 181-8.
- BAGNALL, R. D., WASEEM, N., GREEN, P. M. & GIANNELLI, F. (2002). Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A **BLOOD** 99 (1) : 168-174.
- BAGNALL, R. D., GIANNELLI, F; & GREEN, P. M. (2005a). Gene conversion and evolution of Xq28 duplicons involved in recurring inversions causing severe hemophilia A. *Genome Res.* 15:214-223

- BAGNALL, R. D., GIANNELLI, F; & GREEN, P. M. (2005b). Polymorphism and hemophilia A causing inversions in distal Xq28: a complex picture. **J Thromb Haemost.** 3 (11) : 2598-9
- BARRAI, I.; CANN, H. M.; CAVALLI-SFORZA, L. L. (1979). Segregation analysis of hemophilia A and B. **Am. J. Hum. Genet.** 31: 226-227.
- BARRAI, I., CANN, H. M., CAVALLI-SFORZA, L. L., DE NICOLA, P. (1968). The effect of parental age on rates of mutation for hemophilia and evidence for differing mutation rates for hemophilia A and B. **Am. J. Hum. Genet.** 20: 175-196.
- BIGGS, R., DOUGLAS, A. S., MACFARLANTE, R. G., DACIE, J. V., PITNEY, W. R., MERSKEY, C. & O'BRIEN, J. R. (1952) Christmas disease: a condition previously mistaken for hemophilia. **Brit. Med. J.**; 2 : 1378-1382.
- BRINKE, A., TAGLIAVACCA, L., NAYLOR, J., GREEN, P., GIANGRANDE, P. & GIANNELLI, F. (1996). Two chimaeric transcription units result from an inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene and a region reportedly affected by reciprocal translocations in T-cell leukaemia. **Hum. Molec. Genet.** 5: 1945-1951.
- BOWEN, D. J. (2002). Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. **J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.** 55 : 1-18.
- BOWEN, D. J. & KEENEY, S. (2003). Unleashing the long PCR for detection of the intron 22 inversion of the factor VIII gene in severe hemophilia A. **Thromb. Haemost.**; 89 : 201-202.
- BROCKER-VRIENDS, A. H. J. T., ROSENDAAL, F. R., VAN HOUWELINGEN, J. C., BAKKER, E., VAN OMMEN, G. J. B., VAN DE KAMP, J. J. P., BRIET, E. (1991).

Sex ratio of the mutation frequencies in haemophilia A: coagulation assays and RFLP analysis. *J. Med. Genet.* 28: 672-680.

DA COSTA, T. D. **Análise das mutações G20210A no gene da Protrombina e FV Leidein no gene do fator V em pacientes com hemofilia A** – Trabalho de Conclusão de Curso – Bacharelado em Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, UFRGS, 25p., 2004.

DE BRASI, C., CANDELA, M., CERMELJ, M., SLAVUTISKY, I., LARRIPA, I., BIANCO, R. P. & DE TEZANOS PINTO, M. (2000). Intron 22 factor VIII gene inversion in Argentine families with severe hemophilia A. *Haemophilia*; 6 : 21-22.

ESCOLA DE MEDICINA - Universidade de Washington - A "ribbon diagram" of the structure of the hemophilia domain of human factor VIII. Disponível em: <<http://depts.washington.edu/mednews/research/hemophilia.html>>. Acesso em: 12 de novembro de 2005 (20:30:30).

FAY, P. J.; CHAVIN, S. I.; SCHROEDER, D.; YOUNG, F. E.; MARDER, V. J. (1982). Purification and characterization of a highly purified human factor VIII consisting of a single type of polypeptide chain. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 79: 7200-7204.

FAY, P. J. (1999). Regulation of Factor VIIIa in the intrinsic factor Xase. *Thrombosis and Haemostasis.* 82 (2) : 193-200.

FORBES, C. D. & MADHOK, R. (1991). Genetic disorders of blood coagulation: Clinical presentation and management. In: **Disorders of hemostasis.** 2 ed. 141-2002, W.B. Saunders Company. Philadelphia.

FREIJE, D.& SCHLESSINGER, D. (1992). A 1.6-Mb contig of yeast artificial chromosomes around the human factor VIII gene reveals three regions homologous to

- probes for the DXS115 locus and two for the DXYS64 locus. **Am. J. Hum. Genet.** 51: 66-80.
- GAWRYL, M. S., HOYER, L. W. (1982) Immunologic studies of antihemophilic factor VIII (AHF, VIII:C) – characterization of antigenic determinants using human antibodies. **Clinical Immunology and Immunopathology.** 23 : 517-526.
- GIDDINGS, J. C. **Molecular genetics and immunoanalysis in blood coagulation.** Chichester: Ellis Horwood Ltd., 1988.
- GILL, J. C. (1999). The role of genetics in inhibitor formation. **Thrombosis and Haemostasis.** 82 (2) : 500-5004.
- GILBERT, M. S. (1981). Haemophilic arthropathy: Na overview In: SELIGSOHN, U., RIMON, A., HOROSZOWSKI, H. **Haemophilia.** New York, Alan R. Liss. 157p.
- GITSCHER, J., WOOD, W.I., GORALKA, T. M. (1984). Characterization of the human factor VIII gene. **Nature;** 312 : 326-330.
- GOODEVE, A. C. (1998). Advances in carrier detection in haemophilia. **Haemophilia;** 4 : 358-364.
- HABART, D., KALABOVA, D., HRACHOVINOVA, I. & VORLOVA, Z. (2003). Significant prevalence of the intron 1 factor VIII gene inversion among patients with severe hemophilia A in the Czech Republic. **J. Thromb. Haemost.** 1 : 1323-1324.
- HAJNALKA, A, KLEIN, I., BORS, A, LÁZLÓ, N., ANIKÓ, M., ANDRÁS V., ATTILA, T. (2003). Analysis of large structural changes of the factor VIII gene, involving intron 1 and 22, in severe hemophilia A. **Journal of Hematology;** 88 : 778-784.

HAMSTERS - The Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site. Disponível em:

< <http://europium.csc.mrc.ac.uk/WebPages/Main/main.htm> >. Acesso em: 12 de

novembro de 2005 (20:30:30).

HERMANN, J. (1996). The influence of the age on the mutations to hemophilia A.

**Humangenetics** 3: 1-16.

HOYER, L. W., GAWRYL, M. S. & DE LA FUENTE, B. (1984). Immunochemical

characterization of FVIII inhibitors. **Progress in Clinical and Biological Research.**

150 : 73-85.

HOYER, L. W. (1994). **Haemophilia A.** N. Engl. J. Med.; 330 : 38-47.

HOYER, L. W. (1995). Why do so many haemophilia A patients develop inhibitor?.

**British Journal of Haematology.** 90 : 498-501.

JACQUEMIN, M. G., SAINT-REMY, J. M. (1998). Factor VIII imunogenicity.

**Haemophilia** 4 : 552-557.

KASPER, C., ALEDORT, L. M. COUNTS, R. B., EDSON, J. R., FRATANTONI, J.,

GREEN, D., HAMPTON, J. W. HILGARTNER, M. W., LAZERSON, J., LEVINE,

P. H., MCMILLAN, C. W. POOL, J. G., SHAPIRO, S. S., SHULMAN, N. R. &

EYS, J. V. (1975). A more uniform measurement of factor VIII inhibitors.

**Thrombosis and Diathesis Haemorrhagica.** 34 : 869-872.

KASPER, C. K. (1991). Laboratory tests for factor VIII inhibitors, their variation,

significance and interpretation.. **Blood Coagulation and Fibrinolysis.** 2 (1): 7-10.

KENWRICK, S., LEVINSON, B., TAYLOR, S., SHAPIRO, A. & GITSCHIER, J.(1992).

Isolation and sequence of two genes associated with a CpG island 5-prime of the

factor VIII gene. **Hum. Molec. Genet.** 1: 179-186.

- LAHIRI, D. K., NURBERGER, J. (1991). A rapid nonenzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**. 19 : 5444.
- LANDER, E. S., LINTON, L. M., BIRREN, B., NUSBAUM, C., ZODY, M. C., BALDWIN, J. *et al.* (2001). International Human Genome sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**; 409 : 860-921.
- LAKICH, D., KAZAZIAN, H. H., JR., ANTONARAKIS, S. E. & GITSCHIER, J. (1993). Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. **Nature Genet.** 5: 236-241.
- LEUER, M., OLDENBURG, J., LAVERGNE, J., LUDWIG, M., FREGIN, A., EIGEL, A., LJUNG, R., GOODEVE, A. PEAKE, I. & OLEK, K. (2001). Somatic Mosaicism in Hemophilia A: A Fairly Common Event *Am. J. Hum. Genet.* 69:75-87.
- LEVINSON, B., KENWRICK, S., LAKICH, D., HAMMONDS, G. & GITSCHIER, J. (1990a). A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. **Genomics** 7: 1-11.
- LEVINSON, B., LEHESJOKI, A. E., DE LA CHAPELLE, A. & GITSCHIER, J. (1990b). Molecular analysis of hemophilia A mutations in the Finnish population. **Am. J. Hum. Genet.** 46: 53-62.
- LIU, Q., NOZARI, G. & SOMMER, S. S. (1998a). Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A. **Blood**; 92 : 1945-1951.

- LIU, Q. & SOMMER, S. S. (1998b). Subcycling-PCR for Multiplex Long-Distance Amplification of Regions with High and Low GC Content: Application to the Inversion Hotspot in the Factor VIII Gene. **BioTechniques**; 25 : 1022-1028.
- LJUNG, R., PETRINI, P., LINDGREN, A. C., TENGRORN, L. & NILSSON, I. M. (1992). Factor VIII and factor IX inhibitors in haemophilics. **Lancet**. 339 : 15-50.
- LUSHER, J. M., ARKIN, S., ABILDGAARD, C. F., SCHWARTZ, R. S., KOGENATE PREVIOUSLY UNTREATED PATIENT STUDY GROUP. (1993). Recombinant factor VIII for the treatment of previously untreated patients with hemophilia A – safety, efficacy and development of inhibitors. **N. Eng. J. Med.** 328 : 453-459.
- MILLER SA, DYKES DD, POLESKY HF. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res** 16: 1215.
- MONDORF, W., EHRENFORTH, S., VIGH, Z. LAST, J., TIPPMANN, G. KREUZ, W. SCHARRER, I. (1994). Screening of FVIII:C antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay. **Vox Sanguinis** 66 : 8-13.
- NAYLOR, J. A., GREEN, P. M., MONTANDON, A. J., RIZZA, C. R., GIANNELLI, F. (1991). Detection of three novel mutations in two haemophilia A patients by rapid screening of whole essential region of factor VIII gene. **Lancet** 337: 635-639.
- NAYLOR, J. A., GREEN, P. M., RIZZA, C. R. & GIANNELLI, F. (1992). Factor VIII gene explains all cases of haemophilia A. **Lancet** 340: 1066-1067.
- NAYLOR, J. A., GREEN, P. M., RIZZA, C. R. & GIANNELLI, F. (1993). Analysis of factor VIII mRNA reveals defects in everyone of 28 haemophilia A patients. **Hum. Molec. Genet.** 2: 11-17.



NCBI - PUBMED MEDLINE. Disponível em: < [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/genome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/genome) >.

Acesso em: 12 de novembro de 2005 (20:30:30).

NILSSON, I. M. & LAMME, S. (1980). On acquired hemophilia A - a survey of 11 cases.

**Acta Med.Scand.** 208 : 5-12.

OLDENBURG, J., ROST, S., EL-MAARRI, O., LEUER, M., OLEK, K., MULLER, C. R.

& SCHWAAB, R. (2000). De novo factor VIII gene intron 22 inversion in a female carrier presents as a somatic mosaicism. **Blood.** 96 (8) : 2905-2906.

ORTHO DIAGNOSTICS INC – DIVISION OF BIOLOGICAL MANUFACTURING,  
PHILIP LEVINE LABORATORIES. **Introdução aos princípios de hemostasia.**

1976, New Jersey – USA.

PAVLOVSKY, A. (1947). A contribution to the pathogenesis of hemophilia. **Blood;** 2:  
185-191.

PATTERSON, M., GITSCHIER, J., BLOOMFIELD, J., BELL, M., DORKINS, H.,  
FROSTER-ISKENIUS, U., SOMMER, S., SOBELL, J., SCHAID, D.,  
THIBODEAU, S. & DAVIES, K. E. (1989). An intronic region within the human  
factor VIII gene is duplicated within Xq28 and is homologous to the polymorphic  
locus DXS115 (767). **Am. J. Hum. Genet.** 44: 679-685.

PENNER, J. A. (2001). Haemophilic patients with inhibitors to factor VIII or IX: Variables  
affecting treatment response. **Haemophilia;** 7 : 103-108.

RIEGER, A. **Aspectos genéticos e epidemiológicos dos inibidores na hemofilia A.**

Dissertação de Mestrado – Curso de Pós-Graduação em genética e Biologia  
Molecular da U.F.R.G.S. – 80p., 1996.

- RIEGER, A. & ROISENBERG, I. (1999). Prevalence of Factor VIII Inhibitors in Patients with Hemophilia A in Brazil. **Thromb. Haemost.**; 81 : 475-476.
- ROSENDAAL, F. R., BRIET, E., STIBBE, J., VAN HERPEN, G., GEVERS LEUVEN, J. A., HOFMAN, A., VANDENBROUCKE, J. P. (1990a). Haemophilia protects against ischaemic heart disease: a study of risk factors. **Brit. J. Haemat.** 75: 525-530.
- ROSENDAAL, F. R., BROCKER-VRIENDS, A. H. J. T., VAN HOUWELINGEN, J. C., SMIT, C., VAREKAMP, I., VAN DIJCK, H., SUURMEIJER, T. P. B. M., VANDENBROUCKE, J. P., BRIET, E. (1990b). Sex ratio of the mutation frequencies in haemophilia A: estimation and meta-analysis. **Hum. Genet.** 86: 139-146.
- ROSSETTI, L.C.; GOODEVE, A.; LARRIPA, I.B.; DE BRASI, C.D. (2004a). Homeologous recombination between AluSx-sequences as a cause of hemophilia. **Hum. Mutat.** 24 (5) : 440-445.
- ROSSETTI, L.C.; CANDELA, M.; BIANCO, R.P.; DE TEZANOS, PINTO M.; WESTERN, A.; GOODEVE, A.; LARRIPA, I.B.; DE BRASI, C.D. (2004b). **Blood Coagul. Fibrinolysis.** 15 (7) : 569-572.
- SALDER, J. E. (1998). Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. **Annu. Ver. Biochem.** 67 : 395-424.
- SAMBROCK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. (1998) **Molecular Cloning – A Laboratory Manual.** 3 ed. C.S.H. – Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SAWECKA, J., SKULIMOWSKA, J., WINDYGA, J., LOPACIUK, S. & KOSCIELAK, J. (2005). Prevalence of the intron 22 inversion of the factor VIII gene and inhibitor

- development in Polish patients with severe hemophilia A. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**; 4 : 352-356.
- SCANDELLA, D., MATTINGLY, M., & PRESCOTT, R. (1993). Recombinant factor VIII A2 domain polypeptide quantitatively neutralizes human inhibitor antibodies which bind to A2. **Blood**. 82 : 1767-1775.
- SCHULMAN, I., SMITH, C. H. (1952). Hemorrhagic disease in an infant due to deficiency of a previously undescribed clotting factor. **Blood**; 7 : 794-807.
- SOARES, R. P. S., CHAMONE, D. A. F. & BYDLOWSKI, S. P. (2001). Factor VIII gene inversions and polymorphisms in Brazilian patients with haemophilia A: carrier detection and prenatal diagnosis. **Haemophilia**; 7 : 299-305.
- STIRLING, D. (2003). Subcycling PCR for long-distance amplifications of regions with high and low guanine-cytosine content: amplification of the intron 22 inversion of the FVIII gene. **Methods Mol Biol.**; 226 : 101-104.
- TAGARIELLO, G., BELVINI, D., SALVIATO, R., ARE, A., DE BIASI, E., GOODEVE, A. & DAVOLI, P. (2000). Experience of a single Italian center in genetic counseling for hemophilia: from linkage analysis to molecular diagnosis. **Haematologica** 85 (5) : 525-529.
- TIZZANO, E., VENCESLA', A., CORNET, M., BAENA, M. & BAIGET, M. (2003). Inversion of intron 1 of the factor VIII gene for direct molecular diagnosis of hemophilia A. **Haematologica** 88 (01) : 118-121.
- TIZZANO, E., VENCESLA', A., CORNET, M., BAENA, M. & BAIGET, M. (2005). Utility of a (GT)<sub>n</sub> dinucleotide repeat in intron 1 of the factor 8 gene for haemophilia A carrier diagnosis. **Haemophilia** 11 : 142-144.

- TOOLE, J. J., KNOPE, J. L., WOZNEY, J. M., SULTZMAN, L. A., BUECKER, J. L., PITTMAN, D. D., KAUFMAN, R. J., BROWN, E., SHOEMAKER, C., ORR, E., C., AMPHLETT, G. W., FOSTER, W. V., COE, M. L., KNUTSON, G. J., FASS, D. N. & HEWICK, R. M. (1984). Molecular cloning cDNA encoding human antihaemophilic factor. **Nature**, 312 : 342-347.
- TUDDENHAM, E. G. D. & COOPER, D. N. (1994a). Factor VIII and haemophilia A. **Oxford Monographs on Medical Genetics**; 25 : 19-76.
- TUDDENHAM, E. G. D. & COOPER, D. N. (1994b). **The molecular Genetics of Haemostasis and its Inherited Disorders**. Oxford University Press, New York.
- TUDDENHAM E. G., MCVEY J. H. (1998). The genetic basis of inhibitor development in haemophilia A. **Haemophilia** 4 : 543-545.
- VEHAR, G. A., KEY, B., EATON, D., RODRIGUEZ, H., O'BRIEN, D. P., ROTBLAT, F., OPPERMANN, H., KECK, R., WOOD, W. I., HARKINS, R. N., *et al.* (1984). Structure of human factor VIII. **Nature**. 312 : 337-342.
- VOGEL, F. (1977). A probable sex difference in some mutation rates. **Am. J. Hum. Genet.** 29: 312-319.
- ZIMMERMAN, T. S., RATNOFF, O. D., POWELL, A. E. (1971). Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor VIII deficiency) and von Willebrand's disease. **Journal of Clinical investigation**. 50 : 244-254.