

Andrey dos Santos

**“Caracterização de aspectos genéticos e
imunológicos envolvidos no desenvolvimento de
inibidores em Hemofilia A e B”**

Campinas

2010

Andrey dos Santos

**“Caracterização de aspectos genéticos e
imunológicos envolvidos no desenvolvimento de
inibidores em Hemofilia A e B”**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para
Obtenção do título de Doutor em Clínica Médica,
Área de Concentração Clínica Médica*

Orientadora: **Dra. Margareth Castro Ozelo**

Campinas

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA
UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Sa59c Santos, Andrey dos
“Caracterização de aspectos genéticos e imunológicos envolvidos
no desenvolvimento de inibidores em Hemofilia A e B” / Andrey dos
Santos. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientador : Margareth Castro Ozelo
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Hemofilia. 2. Sistema imune. 3. Haplótipos. 4. Etnia. I.
Ozelo, Margareth Castro. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês: Genetic and immunologic aspects related to the
development of inhibitors in Hemophilia A and B**

Keywords: • Hemophilia
• Immune system
• Haplotypes

Titulação: Doutor em Clínica Médica

Área de concentração: Clínica Médica

Banca examinadora:

Profa. Dra. Margareth Castro Ozelo
Profa. Dra. Suely Meireles Rezende
Profa. Dra. Giselle Zenker Justo
Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad
Profa. Dra. Fabiola Traina

Data da defesa: 24-02-2010

Banca examinadora da tese de Doutorado

Andrey dos Santos

Orientador: Prof^a. Dr^a. Margareth Castro Ozelo

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Suely Meireles Rezende

Suely Meireles Rezende

2. Prof^a. Dr^a. Giselle Zenker Justo

Giselle Zenker Justo

3. Prof^a. Dr^a. Sara Teresinha Olalla Saad

Sara Teresinha Olalla Saad

4. Prof^a. Dr^a. Fabíola Traina

Fabíola Traina

5. Prof^a. Dr^a. Margareth Castro Ozelo

Margareth Castro Ozelo

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 24/02/2010

Dedico esse trabalho aos meus pais, Oswaldo e Eunice, por sempre me incentivarem a ser uma pessoa melhor, pelas lições de humildade, honestidade e perseverança, e principalmente pelo modo alegre como encaram a vida. Obrigado!

Dedico não só esse trabalho mas a minha vida à minha melhor amiga e esposa, Ana Paula, que ao longo destes 15 anos esteve sempre ao meu lado por mais difícil que fosse a situação, sendo essa pessoa forte e amável como sempre foi. Te amo!

AGRADECIMENTOS

À Dra. Margareth Castro Ozelo pela orientação, pelo incentivo, apoio e confiança, por compreender nossas dificuldades e nos ajudar a superá-las.

À Profa. Dra. Joyce pelo grande apoio ao deixar seu laboratório de portas abertas para realizarmos todos nossos experimentos.

Ao Guilherme por sempre me ajudou e se dedicou a essa tese como se fosse sua.

A Ucha pela ajuda tão importante na realização desse trabalho.

A Silmara pela inúmeras análises, coletas e etc, enfim por tudo.

A Andréa que sempre esteve disposta a nos ajudar e pela enorme dedicação a este trabalho.

Ao Dr. Erich pelo grande apoio e incentivo no desenvolvimento desse projeto.

A Deva por toda ajuda prestada a este trabalho.

A Cristina pela inúmeras conversas e risadas ao longo desses anos

Aos amigos Vagner, Gislaine, Aranha, Nenê, Daniela e Zé Márcio por toda ajuda dentro e fora da Unicamp.

Aos amigos do laboratório Ricardo, Daniela, Rosalva, Márcia, Janaína, Tânia, Susan, Barba, Aline, Mari, Josie, Carol, Carla, Fernanda, Bruna, Patrícia pelas sugestões, ajudas e pelas horas agradáveis.

Ao Lab. de Biologia Molecular Dulcinéia, Denise e Daniela

Lab. de Diagnóstico Molecular de doenças onco-hematológicas do Hemocentro.

Ao laboratório de genética humana do CBMEG Dra. Edi, Dra. Maricilda e Madalena.

À Dra. Sylvia Thomas do Hemocentro de Cuiabá-MT, ao Dr. Marcelo Veiga e ao Julio Machado do Hemocentro do Paraná-PR, ao Dr. Denys E. Fujimoto do Hemocentro do Acre - AC e à Dra. Anelisa Strega do Hemocentro da Bahia – BA.

À profa. Dra. Christine Hackel por me ensinar a ser um pesquisador.

A todos os meus familiares que sempre me ajudaram, incentivaram e acreditaram em mim.

A Sandrinha e Edgar pela grande amizade e pelo apoio nos momentos mais difíceis.

A Livia pela ajuda e pelo carinho.

As amigos Archimedes, Fabiano, Danilo, Juliana, Sandra, Tânia, Fernanda, Lúcia e Carol pela vivência maravilhosa durante a graduação e pela amizade que se fortalece a cada dia.

Aos amigos dos Lab. Prof. Durán e Lab. Profa Buba pelas sugestões, ajudas e pelas horas agradáveis e aos vários brindes.

A FAPESP pelo apoio financeiro.

Aos funcionários do Hemocentro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito Obrigado

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da FAPESP (Processo: 05/59621-8).

Lista de Abreviaturas

APC	CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENO
BSA	SORO DE ALBUMINA BOVINA
cDNA	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO COMPLEMENTAR
CD	ANTÍGENO DE SUPERFÍCIE CLONES CELULARES (<i>CLUSTER DIFFERENTIATOR</i>)
cm	CENTÍMETRO
CpG	REGIÕES RICAS EM CITOSINA E GUANINA
CAMK1	PROTEÍNA QUINASE TIPO 1 DEPENDENTE DE CÁLCIO-CALMODULINA
	CADEIA ALFA DA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO DO COMPONENTE C4 DO
C4BPA	COMPLEMENTO
CST7	CISTATINA F
cRNA	ÁCIDO RIBONUCLEICO COMPLEMENTAR
Ct	CICLO <i>THRESHOLD</i> OU CICLO INICIAL
CXCL9	QUIMIOCINA CXC LIGANTE 9
DMSO	DIMETILSULFÓXIDO
dGTP	DESOXIGUANOSINA TRIFOSFATADA
dNTP	DESOXIRRIBONUCLEOTÍDEOS FOSFATADOS
dpm/ug	DECAIMENTO POR MINUTO POR MICROGRAMA
EDTA	ÁCIDO ETILENODIAMINOTETRACÉTICO
ELISA	<i>ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY</i>
FL	FOSFOLIPÍDEOS
FIX	FATOR IX DA COAGULAÇÃO
FIX:C	ATIVIDADE COAGULANTE DO FATOR IX
FIXa	FATOR IX ATIVADO
FVIII	FATOR VIII DA COAGULAÇÃO
FVIII:C	ATIVIDADE COAGULANTE DO FATOR VIII

FVW	FATOR DE VON WILLEBRAND
FX	FATOR X DA COAGULAÇÃO
F8	GENE DO FATOR VIII
F8A	GENE A ASSOCIADO AO FATOR VIII
F8B	GENE B ASSOCIADO AO FATOR VIII
F9	GENE DO FATOR IX
Foxp3	MARCADOR PRESENTE EM LINFÓCITOS T REGULATÓRIOS (<i>FORKHEAD BOX P3</i>)
HA	HEMOFILIA A
HB	HEMOFILIA B
HCV	VÍRUS DA HEPATITE C
HIV	VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA
HLA	ANTÍGENO DE HISTOCOMPATIBILIDADE
Ig	IMUNOGLOBULINA
IL-8	INTERLEUCINA 8
IL-10	INTERLEUCINA 10
IL-18	INTERLEUCINA 18
IL18RAP	RECEPTOR ACESSÓRIO PARA A INTERLEUCINA 18
INT-22	ÍNTRON 22
INV-1	INVERSÃO DO ÍNTRON 1 DO GENE DO FATOR VIII
INV-22	INVERSÃO DO ÍNTRON 22 DO GENE DO FATOR VIII
Int22h1	REGIÃO QUE COMPREENDE O F8A E ILHA CPG
Int22h2	REGIÃO HOMÓLOGA À INT22H1
Int22h3	REGIÃO HOMÓLOGA À INT22H1
I-PCR	PCR INVERSO (PARA DETECÇÃO DA INV-22)
Kb	KILO BASES
Kg	KILOGRAMA
LYPLA3	LISOFSOLFIPASE 3
MHC	COMPLEXO MAIOR DE HISTOCOMPATIBILIDADE
M	MOLAR
mM	MILIMOLAR

mL	MICROLITRO
μL	MICROLITRO
μg	MICROGRAMA
N	NORMAL (<i>NORMALIDADE</i> = Nº DE EQUIVALENTES GRAMA/VOLUME)
ng/mL	NANOGRAMAS POR MILILITRO
nM	NANOMOLAR
nm	NANÔMETRO (UNIDADE DE COMPRIMENTO DE ONDA)
pb	PARES DE BASES
pg	PICOGRAMA
pd-FVIII	CONCENTRADO DE FATOR VIII DERIVADO DO PLASMA HUMANO
PDE4A	FOSFODIESTERASES SUBCLASSE IV A
PEG	POLIETILENO GLICOL
PBS	SALINA TAMPONADA FOSFATADA
PCR	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
PTGS	PROSTAGLANDINA SINTETASE ENDOPERÓXIDO
rFVIIa	FATOR VII RECOMBINANTE ATIVADO
rFVIII	CONCENTRADO DE FATOR VIII RECOMBINANTE
rpm	ROTAÇÕES POR MINUTO
RNA	ÁCIDO RIBONUCLEICO
RNA_m	ÁCIDO RIBONUCLEICO MENSAGEIRO
RT-PCR	PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL
SDS	DODECIL SULFATO DE SÓDIO
SNP	POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA (<i>SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM</i>)
SSC	TAMPÃO SALINO SÓDIO CITRATO
SSPE	TAMPÃO SALINO SÓDIO FOSFATO EDTA
S-PCR	<i>SUBCYCLING-PCR</i> (PARA DETECÇÃO DA INV-22)
TII	TERAPIA DE INDUÇÃO DE IMUNOTOLERÂNCIA
T_m	TEMPERATURA DE FUSÃO (<i>TEMPERATURE OF MELTING</i>)
TGF-β	FATOR DE CRESCIMENTO DE TRANSFORMAÇÃO BETA
TNF-α	FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA

T reg	CÉLULAS T REGULATÓRIAS
TAE	TRIS-ACETATO-EDTA
TTPa	TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA
UI/mL	UNIDADES INTERNACIONAIS POR MICROLITRO
UA	UNIDADES ARBITRÁRIAS
UB	UNIDADE BETHESDA
Xq	BRAÇO LONGO CROMOSSOMO X
V	VOLTS

Sumário

Resumo	xxxix
Abstract.....	xliii
1. Introdução	47
1.1. Hemofilia	49
1.1.2. Epidemiologia da hemofilia	49
1.1.3. Os genes e as proteínas relacionadas à hemofilia.....	50
1.1.3.1.Hemofilia A: fator VIII	50
1.1.3.2.Hemofilia B: fator IX	53
1.1.4. Quadro clínico da hemofilia	55
1.1.5. Inibidores	55
1.1.5.2. Imunologia dos inibidores do fator VIII	59
2. Objetivos	64
3. Justificativa.....	67
4. Casuística e Métodos.....	71
4.2. Confirmação e classificação do tipo de hemofilia	74
4.3. Pesquisa da presença de inibidores contra o FVIII ou FIX.....	75
4.4. Quantificação dos inibidores pela técnica de Bethesda modificada. .	75
4.5. Caracterização, pela técnica de ELISA, das subclasses IgG envolvidas, nos casos onde foi detectada a presença inibidor.	78
4.6. Identificação das alterações moleculares relacionadas à hemofilia. ...	80
4.6.1. Estratégia para detecção de mutações associadas à hemofilia A.	80
4.6.1.1. Detecção da inversão do íntron 22 do gene do fator VIII.	82
<i>4.6.1.1.1. Detecção da inversão do íntron 22 do gene do fator VIII</i> <i>através da técnica de Southern blot.</i>	<i>82</i>

4.6.1.1.1.2. Digestão do DNA genômico a ser pesquisado.	82
4.6.1.1.1.3. Southern Blot.....	82
4.6.1.1.1.4. Hibridização.....	83
4.6.1.1.2. Detecção da inversão do íntron 22 do gene do fator VIII através da técnica de Subcycling-PCR (S-PCR).	84
4.6.1.1.3. Detecção da inversão do íntron 22 do gene do fator VIII através da técnica de PCR inverso (I-PCR).	87
4.6.1.2. Detecção da inversão do íntron 1 do gene do fator VIII.	90
4.6.1.3. Determinação da mutação associada à hemofilia A por seqüenciamento automático do gene do fator VIII.	91
4.6.2. Estratégia para detecção de mutações associadas à hemofilia B.	94
4.7. Extração de RNA a partir de células mononucleares sangüíneas	95
4.7.1. Separação das células mononucleares circulantes.....	95
4.7.2. Extração do RNA de células mononucleares circulantes.....	96
4.8. CodeLink bioarrays	97
4.8.1. Preparação das amostras de cDNA e subsequente cRNA para hibridização nos <i>bioarrays</i>	98
4.8.1.1. Síntese do cDNA	98
4.8.1.2. Purificação da dupla-fita de cDNA	99
4.8.1.3. Síntese da sonda biotinilada de cRNA.....	99
4.8.1.4. Purificação da dupla-fita de cRNA	99
4.8.1.5. Fragmentação do cRNA	99
4.8.2. Hibridização dos <i>biorrays</i>	100
4.8.3. Escaneamento dos <i>bioarrays</i>	100
4.9. Análise da expressão gênica através da técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR)	101

4.9.1.1. Desenho dos primers para a reação.	102
4.9.1.2. Concentração dos primers.....	103
4.9.2.1. Cálculo da análise de eficiência da reação de RT-PCR	107
4.9.3. Análise dos resultados do RT-PCR.....	109
4.10. Análise estatística	109
5. Resultados	111
5.1. Dados demográficos dos casos incluídos.....	113
5.2. Caracterização dos inibidores de acordo com a reatividade e subclasse das imunoglobulinas.....	115
5.3. Identificação das alterações moleculares no gene do FVIII.	118
5.4. Identificação das alterações moleculares no gene do FIX.	119
5.5. Frequência dos haplótipos do gene do FVIII em pacientes hemofílicos A graves e correlação com o risco de inibidor.	121
5.6. Análise de expressão gênica de células mononucleares circulantes em pacientes com e sem inibidores.....	124
5.6.1. Seleção dos pares de pacientes de uma mesma família discordantes para a presença de inibidores.	124
5.6.1.1. Descrição dos pares de uma mesma família selecionados.	125
5.6.2. Seleção de grupos de pacientes não relacionados com presença ou ausência de inibidores.....	129
5.6.2.1. Descrição dos pacientes não relacionados selecionados	130
7. Conclusão	159
8. Referências Bibliográficas	163
9. Anexos	177
ANEXO 1	179
ANEXO 2	181

ANEXO 3	185
ANEXO 4	185

Lista de Tabelas

Tabela 1. Tabela de conversão utilizada para a determinação do título de inibidor (unidade Bethesda).....	78
Tabela 2. Primers para análise da inversão do íntron 1.....	90
Tabela 3. Relação de primers para seqüenciamento do gene do fator VIII.	93
Tabela 4. Seqüências dos primers utilizados na amplificação das diferentes regiões do gene do fator IX	95
Tabela 5. Características dos pacientes selecionados para realização da técnica de <i>microarrays</i>	125
Tabela 6. Características dos pacientes não relacionados selecionados para realização da técnica de <i>*microarrays(pool)</i> e <i>°RT-PCR</i>	130
Tabela 7. Seqüência do <i>primers</i> e tamanho dos fragmentos amplificado para cada gene analisado por RT-PCR	103
Tabela 8. Concentração ideal de cada par de <i>primer</i> obtida com a padronização do RT-PCR.....	103
Tabela 9. Distribuição dos casos incluídos de acordo com diagnóstico e procedência.....	114
Tabela 10. Caracterização dos inibidores de acordo com as subclasses de imunoglobulinas.	117
Tabela 11. . Outras mutações identificada em pacientes hemofílicos A.	119
Tabela 12. Mutações identificada em pacientes hemofílicos B.....	121
Tabela 13. Frequência dos haplótipos do gene do FVIII e prevalência de inibidores em pacientes hemofílicos A graves.....	123
Tabela 14. Genes selecionados por meio da análise comparativa dos dados obtidos na plataforma Codelink e suas respectivas razões lineares	136

Lista de Figuras

Figura 1 Representação dos gene do FVIII humano..	50
Figura 2. Representação da formação da inversão do íntron 22 e íntron 1.....	52
Figura 3. Representação dos domínios da proteína do FVIII humano.	53
Figura 4. O gene do fator IX	54
Figura 5. Representação dos seis haplótipos (H1 a H6) da proteína do FVIII.....	59
Figura 6. Representação da resposta imune ao FVIII.	60
Figura 7. Representação dos domínios do FVIII humano.	61
Figura 8. Esquema de comparação entre técnica Bethesda clássica e a técnica modificada ou Nijmegen	76
Figura 9. Determinação do título de inibidor	77
Figura 10. Estratégia para detecção de mutações na hemofilia A.....	81
Figura 11. Estratégia para detecção da INV-22 por <i>Southern blot</i>	84
Figura 12. Representação das seqüências homólogas do íntron 22 e localização dos primers utilizados conforme técnica S-PCR..	86
Figura 13. Detecção da inversão do íntron 22 do gene do fator VIII através da técnica de S-PCR.....	87
Figura 14 Detecção da inversão do íntron 22 do gene do fator VIII através da técnica da PCR inverso (I-PCR).....	89
Figura 16. Detecção da inversão do íntron 1 do gene do fator VIII..	91
Figura 15. Representação da inversão do íntron 1 do gene fator VIII.	91
Figura 17. Ilustração da formação de três fases para a separação de células mononucleadas..	96
Figura 18. Análise da qualidade do RNA extraído.....	97
Figura 19. Imagem parcial resultante dos <i>bioarrays</i> após escaneamento.....	101
Figura 20. Exemplificação da análise da curva de amplificação após a reação de RT-PCR.....	106
Figura 21. Exemplificação da análise da eficiência da amplificação do RT-PCR.	108
Figura 22. Distribuição dos casos de hemofilia incluídos no estudo.....	113

Figura 23. Par 1. Heredograma representando o histórico familiar para hemofilia (FA 037).....	126
Figura 24. PAR 2. Heredograma representando o histórico familiar para hemofilia (FA 181).....	127
Figura 25. PAR 3. Heredograma representando o histórico familiar para hemofilia (FA 161)	128
Figura 26. Par 4. Heredograma representando o histórico familiar para hemofilia (FA 243).	129
Figura 27. Representação da análise comparativa de expressão entre os pares de mesma família discordantes para a presença de inibidores.....	134
Figura 28. Representação da análise comparativa final da triagem de genes utilizando <i>bioarrays</i>	135
Figura 29. Representação gráfica comparativa da mediana da expressão do gene IL-10	143
Figura 30. Representação gráfica comparativa da mediana da expressão do gene IL-8.	143
Figura 31. Representação gráfica comparativa da mediana da expressão do gene CST7.	144
Figura 32. Representação gráfica comparativa da mediana da expressão do gene C4BPA.....	144
Figura 33. Representação gráfica comparativa da mediana da expressão do gene CXCL9.....	145
Figura 34. Representação gráfica comparativa da mediana da expressão do gene PDE4A	145
Figura 35. Representação gráfica comparativa da mediana da expressão do gene CAMK1	146
Figura 36. Representação gráfica comparativa da mediana da expressão do gene IL18RAP	146
Figura 37. Representação gráfica comparativa da mediana da expressão do gene PTGS1	147

Figura 38. Representação gráfica comparativa da mediana da expressão do gene LYPLA3	147
Figura 39. Representação gráfica comparativa da mediana da expressão de todos genes analisados.....	148
Figura 40. Representação gráfica da análise comparativa entre os genes IL-8 e IL-10	149
Figura 41. Representação gráfica da análise comparativa entre os genes IL-8, IL-10 e CST7	150

Resumo

Uma complicação decorrente do tratamento da hemofilia é a formação de anticorpos neutralizadores da atividade coagulante do fator VIII ou IX (inibidores). Diversos fatores estão relacionados com o desenvolvimento desses inibidores em indivíduos com hemofilia, incluindo fatores genéticos e ambientais. Entre os fatores genéticos, a mutação associada ao diagnóstico da hemofilia é um fator de risco bem documentado. Recentemente foi observada a maior ocorrência de inibidores em indivíduos da etnia negra. O objetivo deste trabalho foi analisar os aspectos genéticos e não genéticos envolvidos no desenvolvimento de inibidores.

Foram incluídos nesse estudo 411 pacientes hemofílicos, sendo 321 com hemofilia A (HA) (238 famílias) e 99 com hemofilia B (HB) (59 famílias). A presença de inibidores foi constatada apenas entre os pacientes HA graves. Do total de 220 HA graves desse estudo, 46 (20,9%) apresentaram inibidor detectado em pelo menos uma ocasião após sua inclusão no estudo. Mutações consideradas de alto-risco para o desenvolvimento de inibidores foram identificadas em 125/220 pacientes HA graves (58,8%), e 33 deles desenvolveram inibidores (26,4%). Considerando o grupo étnico de acordo com traços físicos e ancestralidade, 38% dos pacientes HA graves foram classificados como negros. A incidência de inibidores foi maior nesse grupo de pacientes (31% do total de pacientes HA graves classificados como negros) quando comparada aos pacientes caucasóides (20% do total de pacientes HA graves classificados como caucasóides). Recentemente, foi observado que a maior incidência de inibidores em uma população norte-americana de pacientes com HA, estava relacionada com a presença de determinados haplótipos no gene do fator VIII. Esta observação poderia ser explicada pelo fato de as proteínas expressas pelos haplótipos que aparecem exclusivamente entre a população negra (denominados H3 e H4), estarem ausentes nos concentrados de fator VIII recombinantes utilizados rotineiramente no tratamento desses pacientes. Em nossa análise a presença desses haplótipos não está relacionada com a maior frequência de inibidor na população negra desse estudo. Além disso, a distribuição dos diferentes haplótipos do gene do fator VIII, classificados de H1 a H6, foi distinta entre todos os grupos étnicos brasileiros e norte-americanos. Essa observação

pode ser explicada pela origem distinta entre os negros que imigraram da África para o Brasil e para a América do Norte, assim como o alto índice de miscigenação de nossa população.

Em outra fase desse estudo, foi realizada a análise comparativa da expressão gênica a partir de amostras de RNA mensageiro (RNAm) extraídas em pool leucocitário de pacientes com HA grave, com ou sem a presença de inibidores. Na avaliação que incluiu numa primeira análise pacientes de uma mesma família discordante para a presença de inibidor e, em uma segunda fase, indivíduos não relacionados, foram observados 50 genes mais expressos e 16 genes menos expressos em pacientes com inibidor em comparação aos sem inibidor. Dentre esses genes foram selecionados dez, levando-se em conta sua participação na resposta imune ou sua correlação prévia com o desenvolvimento de inibidores em outros estudos. Pela técnica de PCR em tempo real, observou-se que os genes da interleucina 8 (IL-8) e da cistatina F (CST7) demonstraram ser mais expressos em pacientes com inibidor, enquanto que o gene da interleucina 10 (IL-10) foi menos expresso nesse grupo de pacientes. Dessa forma, nossos resultados fortalecem a idéia de que o mecanismo de desenvolvimento de inibidores em hemofilia é complexo e ainda não totalmente esclarecido e que existe um grande envolvimento de diversos genes relacionados com sistema imune na formação desses inibidores.

O estudo em diferentes populações é uma importante etapa para o entendimento dos fatores de risco para o desenvolvimento de inibidores. Esse foi o primeiro trabalho realizado no Brasil incluindo pacientes de diversas regiões e analisando simultaneamente diferentes fatores e seu envolvimento com o desenvolvimento de inibidores. A determinação desses fatores de risco ajudará no futuro a determinar um tratamento diferenciado para o controle e sobretudo prevenção do desenvolvimento de inibidores.

Abstract

The most serious complication of the treatment of hemophilia is the development of neutralizing antibodies to coagulation activity of factor VIII or IX (inhibitors). Several risk factors are related to the development of these inhibitors in patients with hemophilia, including genetic and environmental factors. Among genetic factors, the mutation associated with the diagnosis of hemophilia is a risk factor well documented. Recently, it was observed a higher incidence of inhibitors in African ancestry patients. The aim of this study was to analyze the genetic and non-genetic factors involved in the development of inhibitors.

The study included 411 hemophilia patients, of which 321 with hemophilia A (HA) and 99 with hemophilia B (HB), belonging to a total of 238 and 59 families, respectively. The inhibitors were observed only in severe HA patients. From the 220 severe HA, 46 (20.9%) had inhibitor. The high risk mutation for the development of inhibitors were identified in 125 / 220 (58.8 %) severe HA patients, and 33 (26.4 %) of them developed inhibitors. Considering the ethnic group according to physical traits and ancestry, 38 % of severe HA patients were classified as black. The incidence of inhibitors is higher in this group of patients (31%) when compared to Caucasian patients (20%). The higher risk of inhibitor among African-Brazilians, could not be explained by the presence of the distinct factor VIII haplotypes, such as H3 and H4, as suggested in previous study. In fact, the prevalence rates of these haplotypes were distinct between Brazilians and North Americans, probably due to the fact that migrations of blacks to Brazil and to North America were originated from different geographic areas of Africa.

In another phase of this study, we performed a comparative analysis of gene expression in samples of messenger RNA (mRNA) extracted from leukocytes of inhibitor and non-inhibitor patients with severe HA was performed. The evaluation consisted of an initial analysis of severe HA patients siblings, or from the same family, discordant for inhibitor development and in a second phase a group of unrelated individuals. Using the bioarrays technology 50 genes were upregulated and 16 were downregulated in inhibitor patients compared with non-inhibitor patients. Ten genes were selected among them, which are involved in immune response and were related to inhibitors development in other studies. It

was observed by real time PCR that the genes for interleukin 8 (IL-8) and cystatin F (CST7) were upregulated and for interleukin 10 (IL-10) was downregulated in inhibitor patients.

In conclusion, our results strengthen the idea that the mechanism of inhibitor development in hemophilia is complex, not clear and there is a large involvement of several genes related to the immune system in the development of these inhibitors. The study in different populations is important to understand the risk factors for the development of inhibitors. This is the first work in Brazil, to study patients from various regions and to performe analysis of different factors and their involvement in the development of inhibitors. The determination of these risk factors will help in the future to determine differential treatment for the control and in particular, for preventing the development of inhibitors.

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hemofilia

A hemofilia é uma doença hemorrágica hereditária caracterizada pela deficiência ou anormalidade da atividade coagulante do fator VIII (hemofilia A) ou do fator IX (hemofilia B). Os genes que codificam a produção dos fatores VIII e IX estão localizados no cromossomo X nas regiões Xq-28 e Xq-26, respectivamente (Gitschier *et al.*, 1984; Yashitake *et al.* 1985). Por esta razão a hemofilia A (HA) e a hemofilia B (HB) são doenças ligadas ao cromossomo X e, sendo recessivas, afetam quase que exclusivamente indivíduos do sexo masculino, através da transmissão pela mãe portadora. Porém, em cerca de 30% dos casos, a doença origina-se a partir de mutação “*de novo*”, fenômeno que pode ocorrer na mãe ou no feto. As mulheres portadoras são habitualmente assintomáticas e casos de mulheres hemofílicas são raros, ocorrendo devido à presença de dois alelos dos genes fator VIII ou fator IX afetados, ou decorrentes da inativação do cromossomo X contendo o gene normal.

1.1.2. Epidemiologia da hemofilia

A hemofilia A representa aproximadamente 80% dos casos de hemofilia, afetando um para cada 10.000 nascimentos masculinos, enquanto que a hemofilia B ocorre em um para cada 30.000 nascimentos masculinos. Não existe um grupo étnico que apresente uma maior ou menor incidência desta doença. De acordo com o Registro de Coagulopatias Hereditárias do Ministério da Saúde (<http://portal.saude.gov.br/saude>) no ano 2007, 8172 pacientes hemofílicos (6.881 hemofílicos A e 1.291 hemofílicos B) estavam cadastrados no Brasil. O tratamento dos pacientes com hemofilia é caro. Por ano, são gastos em nosso país, em torno de US\$ 150 milhões com a importação de hemoderivados, incluindo os fatores VIII e IX da coagulação, destinados ao tratamento desses pacientes.

1.1.3. Os genes e as proteínas relacionadas à hemofilia

1.1.3.1. Hemofilia A: fator VIII

O gene do fator VIII (*F8*) está localizado no braço longo do cromossomo X (banda Xq28) e compreende uma região de 186 Kb, constituído por 26 éxons, separados por 25 íntrons. Os éxons variam entre 69 a 262 pb, exceto os éxons 14 e 26, que contêm 3.106 e 1.958 pb, respectivamente. O RNA mensageiro (RNAm) possui 9 Kb (Gitschier *et al.*, 1984) (Figura 1).

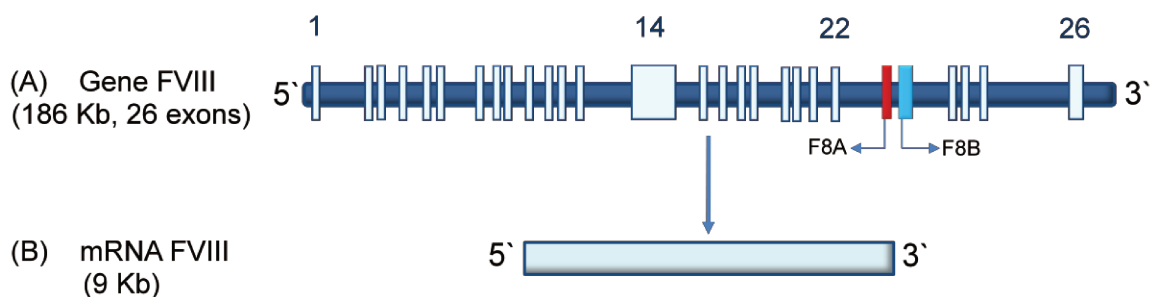


Figura 1 Representação do gene do FVIII humano. (A) O gene do FVIII humano formado por 26 éxons (representados por retângulos em cores azuis claros) incluindo as regiões dos genes *F8A* (retângulo em cor vermelho) e *F8B* (retângulo em cor azul), região não codificada representada por retângulos em cores azuis escuros. (B) O RNA mensageiro (RNAm) do gene do FVIII humano de 9 Kb (representado por um retângulo em cor azul claro).

O *F8* compreende cerca de 0,1% do cromossomo X e em 80% é constituído por regiões de íntrons. O maior íntron é o 22 (INT22) com 32 Kb. Esta região contém uma ilha de nucleotídeos CpG, situados a 10 Kb do éxon 22, que podem funcionar como regiões promotoras bidirecionais, caracterizando a existência de dois genes: *F8A* e *F8B*. O gene *F8A*, que é transcrito em direção oposta ao gene do fator VIII possui 1,8 Kb, enquanto que o *F8B* com 2,5 Kb é transcrito no mesmo sentido do fator VIII (Levinson *et al.*, 1990 e 1992). Duas cópias homólogas do gene *F8A* foram descritas em uma região distante de

aproximadamente 500 Kb em direção ao telômero. A função do F8A e F8B ainda é desconhecida. Cerca de 40% dos casos de hemofilia A classificados como grave, ou seja, com < 1% de atividade do FVIII, são decorrentes de um rearranjo molecular que leva à inversão do íntron 22 do gene do fator VIII (INV-22) (Naylor *et al.*, 1992). Essa mutação é decorrente de uma recombinação entre uma região de 9,5 Kb do íntron 22 (Int22h1) e uma das duas regiões extragênicas homólogas Int22h2 e Int22h3, que resultarão respectivamente na inversão íntron 22 do tipo I ou tipo II (Antonarakis *et al.*, 1995) (Figura 2A). Recentemente, Bagnall *et al.*, (2002) identificou uma segunda inversão de seqüências do íntron 1 do gene do fator VIII (INV-1) que está presente em cerca de 5% dos pacientes com hemofilia A grave. Entre os outros defeitos do gene do FVIII causadores de hemofilia, a maioria deles é decorrente de substituições de um único nucleotídeo e somente em 5% dos casos há inserções ou deleções (Figura 2B).

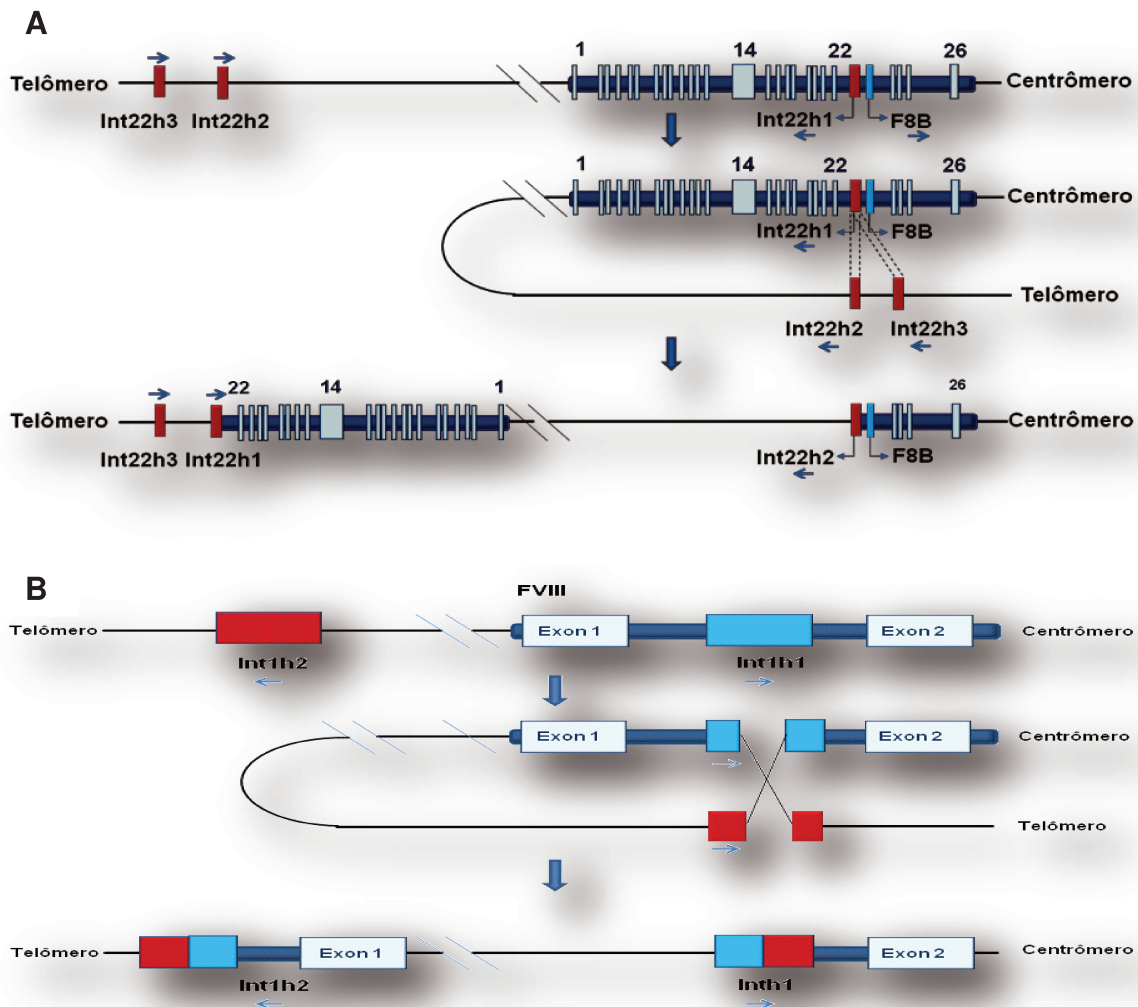


Figura 2. Representação da formação da inversão do íntron 22 e íntron 1. (A) A linha representa o DNA que está fora do gene F8 . No íntron 22 do gene F8, um fragmento (denominado *int22h1*) tem similariedade com a seqüência de dois fragmentos que são distais ao gene F8 (*int22h2* e *int22h3*). As setas indicam a orientação das seqüências repetidas (*int22h1*, *int22h2* e *int22h3*). Por recombinação homóloga intracromossomal, uma destas regiões forma um cruzamento estrutural sobre o elemento correspondente no íntron 22, resultando em uma inversão de éxons 1-22 em relação aos éxons 23-26 do gene F8. A recombinação do *int22h1* pode ocorrer com *int22h2* ou *int22h3*. A Figura **B** representa a região do íntron 1 do gene do FVIII entre o éxon 1 e 2, contendo uma seqüência repetida *int1h1* (azul). A linha representa o DNA fora do gene do FVIII e a seqüência repetida homóloga ao *int1h1* é representada na caixa vermelha *int1h2*. Os passos subsequentes representam a recombinação homóloga entre as duas seqüências repetidas *int1h*, explicando a inversão do íntron 1.

Admite-se que a taxa de mutação do gene do fator VIII é muito elevada ($2,4 \times 10^{-5}$ por geração) (Resta *et al.*, 1994), em decorrência do seu grande tamanho, da presença de regiões onde as mutações são mais comuns (*hot spots*) e uma estrutura peculiar que facilita a ocorrência de rearranjos que silenciam o gene. Estes fatos ajudam a explicar a persistência da doença por várias gerações, já que no passado ela era freqüentemente fatal nas crianças.

A proteína do fator VIII (FVIII) é constituída por seis domínios A1-A2-B-A3-C1-C2 (Ver *et al.*, 1984). Cada subunidade A possui 350 aminoácidos. Trata-se de uma região altamente conservada nas diferentes espécies e pode estar envolvida na capacidade desta proteína em se ligar ao metal cobre. Os domínios C1 e C2 com 150 aminoácidos, estão envolvidos na capacidade de ligação aos fosfolipídeos. O domínio B representa 40% da proteína e é codificado pelo éxon 14 do *F8*. No entanto, o domínio B aparentemente tem pouca participação no processo da coagulação, sendo perdido quando o FVIII é ativado pela trombina. Os domínios A e C são homólogos aos domínios presentes no fator V da coagulação (Figura 3).



Figura 3. Representação dos domínios da proteína do FVIII humano. Proteína formada pelos domínios A1-A2-B-A3-C1-C2. Os domínios A2, C2 e A3 são locais de ligação do fator X (FX), FIXa, fator de Von Willebrand (FvW) e fosfolipídios (FL) ao FVIII.

1.1.3.2. Hemofilia B: fator IX

O gene do fator IX (*F9*) com 34Kb, também está localizado na extremidade do braço longo do cromossomo X (banda Xq-27), mas em região distante do local envolvido com síntese do FVIII. O *F9* possui oito éxons que codificam um RNAm

com 2,8 Kb. O gene foi inicialmente clonado em 1982 (Choo *et al.*, 1982), e seqüenciado em 1985 (Yoshitake *et al.*, 1982).

O fator IX (FIX) é uma glicoproteína com 415 aminoácidos e tem quatro domínios, como os outros fatores da coagulação dependentes da vitamina K. O primeiro domínio (Gla) contém os resíduos de ácido Y-carboxiglutâmico necessários para ligação, dependente de íons cálcio, do fator IX aos fosfolípidos e às células endoteliais. As funções dos dois domínios semelhantes ao fator de crescimento epidérmico, domínio EGF-1 e EGF-2, não são inteiramente claras, parecendo estar relacionadas com ligação do FIX aos fatores VIII e X e à incorporação do FIX ativado ao “complexo tenase”. No último domínio, o domínio catalítico, localiza-se o sítio ativo serina-protease do FIX (Figura 4). De maneira oposta à hemofilia A, a taxa de mutação espontânea no gene do FIX é relativamente baixa (Rodgers *et al.*, 1999).

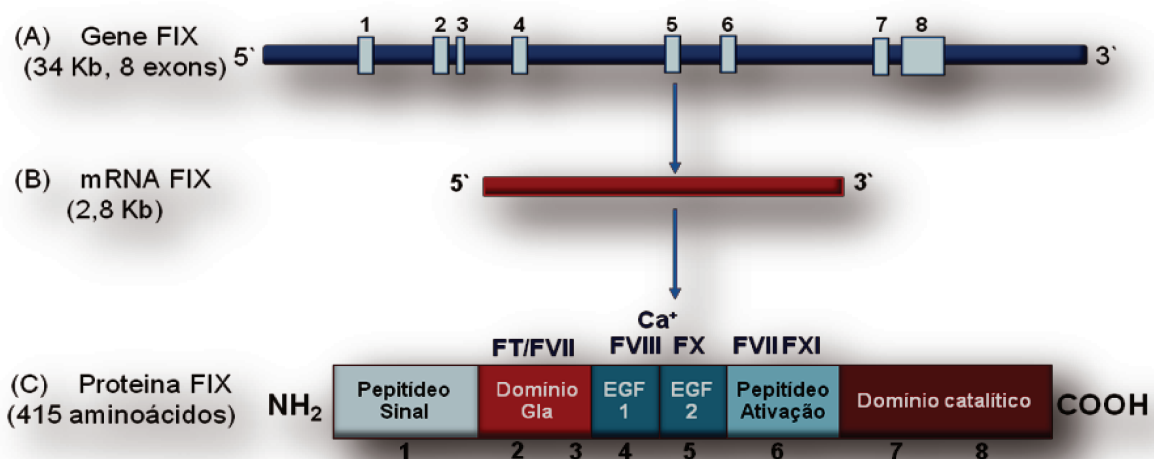


Figura 4. O gene do fator IX (A) Oito éxons que codificam um RNAm (B) com 2,8 Kb. (C) O precursor da proteína do FIX é codificado pelos éxons: 1 que codifica um peptídeo sinal na extremidade amino terminal (NH₂); éxons 2 e 3 codificam o pró-peptídeo e o domínio Gla onde ocorre a ligação do FIX ao complexo FT/FVII; os éxons 4 e 5 codificam dois fatores de crescimento epidérmico (EGF 1 e o EGF 2) que são importantes na ligação de cálcio e FVIII e FX; o éxon 6 codifica o peptídeo de ativação, que é clivado por fator VII e XI para produzir FIX ativado e os éxons 7 e 8 codificam o domínio catalítico que representa a serina-protease.

1.1.4. Quadro clínico da hemofilia

A apresentação clínica é semelhante para a hemofilia A ou B, sendo caracterizada por sangramentos intra-articulares (hemartroses), hemorragias musculares ou em outros tecidos ou cavidades. Os episódios hemorrágicos podem surgir espontaneamente ou após traumas e variam de acordo com a atividade residual coagulante do FVIII ou FIX. Pacientes com níveis circulantes inferiores a 1% do normal (hemofilia grave) habitualmente apresentam sangramentos espontâneos, pacientes com 1% a 5% (hemofilia moderada) podem apresentar sangramentos espontâneos, mas com menor frequência do que entre os hemofílicos graves. Pacientes com níveis de 5% a 40% (hemofilia leve) comumente apresentam sangramentos somente após traumas. A terapêutica da hemofilia está basicamente fundamentada na administração de concentrados de fatores de coagulação em resposta ou para prevenir os episódios hemorrágicos. Além das complicações hemorrágicas agudas os pacientes hemofílicos sofrem especialmente de três tipos de complicações crônicas: a) as artropatias em decorrência dos sangramentos intra-articulares recorrentes; b) as doenças infecciosas transmitidas por derivados do sangue, sendo dois problemas graves em especial a contaminação pelo vírus HIV e a hepatite C; c) o desenvolvimento de anticorpos capazes de inibir a função coagulante do FVIII ou FIX (inibidores).

1.1.5. Inibidores

Entre as complicações crônicas associadas à hemofilia, o desenvolvimento de inibidores tem sido um assunto de destaque no meio acadêmico, devido sua gravidade e frequência. Os inibidores são aloanticorpos neutralizadores da atividade coagulante do FVIII ou FIX desenvolvidos por pacientes hemofílicos, como complicação decorrente do tratamento da hemofilia, ou seja, a administração de concentrados destes fatores da coagulação. Clinicamente a presença desses anticorpos dificulta a indução da hemostasia terapêutica a partir da reposição dos concentrados de fator. Essa é considerada uma complicação grave, pois as alternativas de tratamento nessa situação, além de não serem capazes de garantir com eficácia a hemostasia, são de altíssimo custo. Em alguns

casos o uso de altas doses do concentrado de fator pode ser suficiente, mas na maioria das vezes é necessário o uso de produtos que possuem a capacidade de gerar trombina independente da via do FVIII ou FIX (produtos *bypass*), como o concentrado de protrombina parcial ativado (CPPa) e recentemente tem sido utilizado o fator VII ativado (rFVIIa) (Hedner *et al.* 2001).

O tratamento de indução de imunotolerância (TII) é a única forma terapêutica disponível atualmente que é capaz de erradicar a presença do inibidor. Esse tratamento é baseado na administração freqüente de altas doses de FVIII (200 UI/kg/dia) ou baixas doses (50 UI/kg/3 x por semana), associado ou não a medicamentos imunossupressores (DiMichele, 2007). Esse tratamento pode durar vários meses, ou até anos. As limitações sobre o TII são relacionadas ao alto custo e à necessidade de infusões endovenosas freqüentes, o que pode representar um problema, sobretudo para as crianças. Além disso, não há garantia de sucesso para todos os casos.

No caso de hemofilia B a presença de inibidor contra o FIX pode causar graves reações alérgicas, incluindo anafilaxia. Tais reações podem ocorrer na primeira infusão de fator exógeno IX após o desenvolvimento do inibidor, mesmo antes do inibidor ser diagnosticado. Além disso, os protocolos de TII para hemofilia B podem apresentar o risco adicional do desenvolvimento de síndrome nefrótica, em decorrência da precipitação do imunocomplexo formado entre FIX e o anticorpo (Ewenstein *et al.* 1997).

De acordo com estudos realizados em populações européias e norte-americanas o risco acumulativo de inibidores varia de 20% a 30% entre os pacientes com hemofilia A e de 1% a 5% entre pacientes com hemofilia B. Em um estudo de meta-análise foi demonstrado que a prevalência de inibidores entre todos os hemofílicos A foi de 5% a 7%, e entre os hemofílicos A grave foi de 12% a 13% (Wight & Paisley, 2003). Um dos fatores que predispõe ao desenvolvimento de inibidores é o tipo de mutação nos genes do FVIII ou FIX. De fato pacientes com mutações consideradas de alto risco para o desenvolvimento de inibidores como as inversões do íntron 22 e íntron 1, grandes deleções, mutações *nonsense*, pequenas inserções ou deleções fora de regiões com

repetição de nucleotídeos A e mutações *missense* nos domínios A2, C1 e C2, apresentam 7 a 10 vezes maior risco de desenvolverem inibidor, quando comparados aos pacientes com mutações consideradas de baixo risco para o desenvolvimento de inibidores como mutações do tipo *splice alternativo*; pequenas inserções ou deleções em regiões de repetições A; e mutações *missense* nos demais domínios do FVIII. (Oldenburg *et al.*, 2002).

Recentemente foi sugerido que não só o tipo de mutação envolvida está associado ao risco de desenvolvimento de inibidor, mas sim a associação da mutação específica e o subtipo de antígeno de histocompatibilidade (HLA) classe II (White *et al.*, 2005).

Além disto, outros fatores de risco ao desenvolvimento de inibidores são reconhecidos, como a presença de inibidor no histórico familiar, idade com a qual se iniciou o tratamento (Lorenzo *et al.* 2001), alterações específicas do sistema imunológico (Astermark *et al.*, 2006), o tipo de produto utilizado na reposição de fator (Goudemand *et al.*, 2005). Alterações associadas no momento de desenvolvimento de inibidores (infecções associadas) também podem influenciar o aparecimento de inibidor (Bray *et al.*, 1994).

DiMichele *et al.* (2002) demonstrou que pacientes hemofílicos americanos com ascendência africana e hispânica apresentavam maior incidência de inibidores. No entanto, apesar da intensa influência africana na população brasileira, a incidência de inibidores em hemofílicos relatada no Brasil é inferior ao observado em outras populações, apenas cerca de 9,9% entre hemofílicos A testados para a presença de inibidor (Rezende *et al.*, 2009). Este fato pode ser explicado em parte devido à dificuldade em se obter dados corretos e atualizados destes inibidores, cuja investigação ainda não é realizada rotineiramente em todos os serviços que prestam atendimento a este tipo de paciente. No entanto, é possível devido à intensa miscigenação da população brasileira, que de fato o risco do desenvolvimento de inibidores em nossa população seja distinto do observado em outras populações.

1.1.5.1. Presença de haplótipos distintos do FVIII e risco de inibidor.

Recentemente Viel *et al.* (2007) identificaram quatro polimorfismos de base única (SNP) (R484H, R776G, M2238V e D1241E) que codificam seis haplótipos (H1 a H6) para a forma natural da proteína do FVIII, conforme descritos na Figura 5 (Viel *et al.*, 2007). Em 2009, estes autores demonstraram que cinco destes haplótipos (H1, H2, H3, H4 e H5) foram expressos em pacientes hemofílicos negros norte-americanos, enquanto apenas dois haplótipos (H1 e H2) em caucasóides. O haplótipo mais comum H1 está presente em todos os grupos étnicos e expressa a proteína do FVIII recombinante comercial (rFVIII) Kogenate® (Bayer HealthCare Pharmaceuticals), enquanto que o H2, que também está presente em todos os outros grupos étnicos, e expressa a proteína de outro rFVIII, o Recombinate® (Baxter Healthcare Corporation). O haplótipo H2 é a forma mais comum entre os hemofílicos negros norte-americanos (38%). No entanto, os haplótipos H3, H4 e H5, cujas proteínas estão ausentes entre os dois produtos recombinantes são apenas encontrados entre os negros norte-americanos. Na avaliação realizada pelos autores sugere que a presença do haplótipo H3 e H4, cujas proteínas estão ausente nos concentrados de rFVIII, está relacionada com a maior incidência de inibidores. Portanto, isto sugere que os haplótipos distintos do gene do FVIII contribuem farmacogeneticamente para um risco elevado no desenvolvimento de inibidor em negros (Viel *et al.*, 2009).

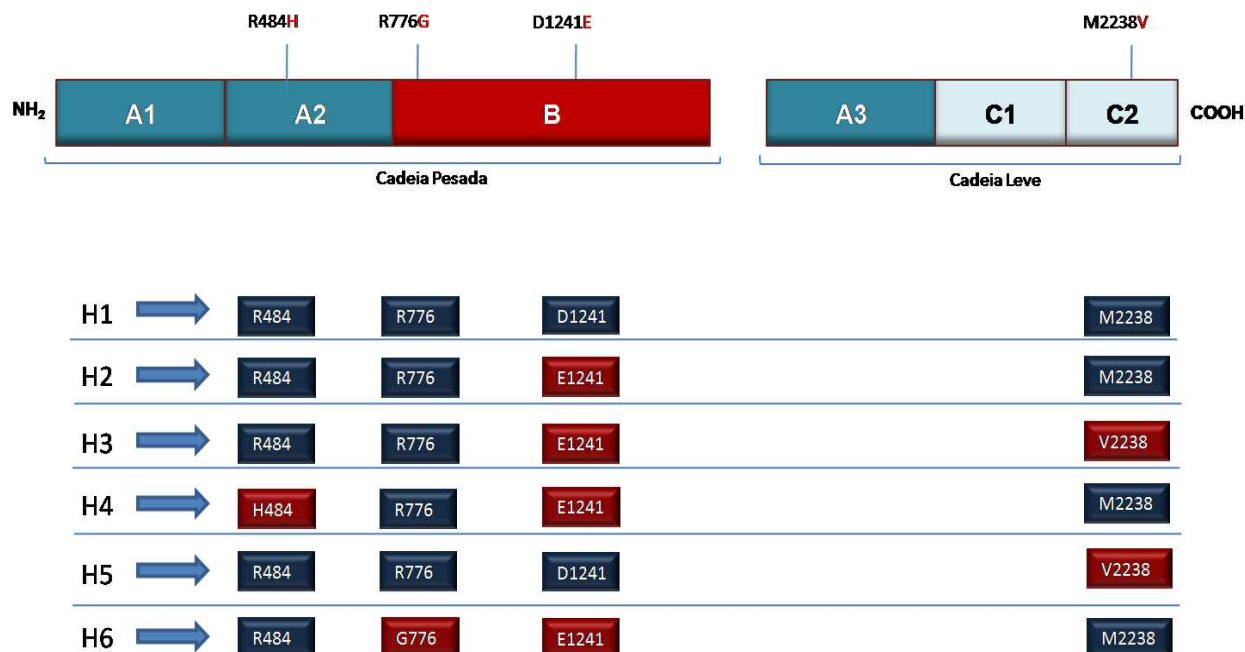


Figura 5. Representação dos seis haplótipos (H1 a H6) da proteína do FVIII. A ocorrência dos polimorfismos R484H, R776G, M2238V e D1241E no gene do FVIII está relacionada com a presença de seis haplótipos do FVIII. Estrutura linear da proteína do FVIII com os domínios distintos representando os quatro polimorfismos de base única (SNP) não sinônimos (R484H, R776G, D1241E e M2238V). Seis haplótipos distintos (H1 a H6), que são codificados por quatro SNPs no *F8* (as mudanças de aminoácidos são representados pelos retângulos em vermelho).

1.1.5.2. Imunologia dos inibidores do fator VIII

O mecanismo que envolve o desenvolvimento desses inibidores é bastante complexo e ainda não esclarecido completamente. Acredita-se que quando o FVIII é administrado na circulação sanguínea, ele é captado pelas células apresentadoras de antígeno (APC), como as células dendríticas, que degradam o FVIII em pequenos peptídeos de 8-12 aminoácidos os quais são carregados por moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe II até a superfície das APCs. Caso esse processo ocorra num contexto de “perigo” ao

sistema inflamatório, as APCs ou células dendríticas tornam-se maduras e poderão amplificar essa resposta estimulando moléculas coestimulatórias de superfície. As células dendríticas maduras migram para órgãos linfóides secundários e apresentam o antígeno a células T auxiliares ou linfócitos T *helper*, CD4+. A resposta imune anti-FVIII é dependente de linfócitos T CD4+ que reconhecem o complexo MHC-classe II – peptídeo FVIII. Os linfócitos T ativados ativam linfócitos B que passam a sintetizar anticorpos específicos contra o FVIII (Figura 6). Caso esses anticorpos sejam capazes de neutralizar a atividade coagulante do FVIII, eles são chamados de inibidores (Reding *et al.* 2006).

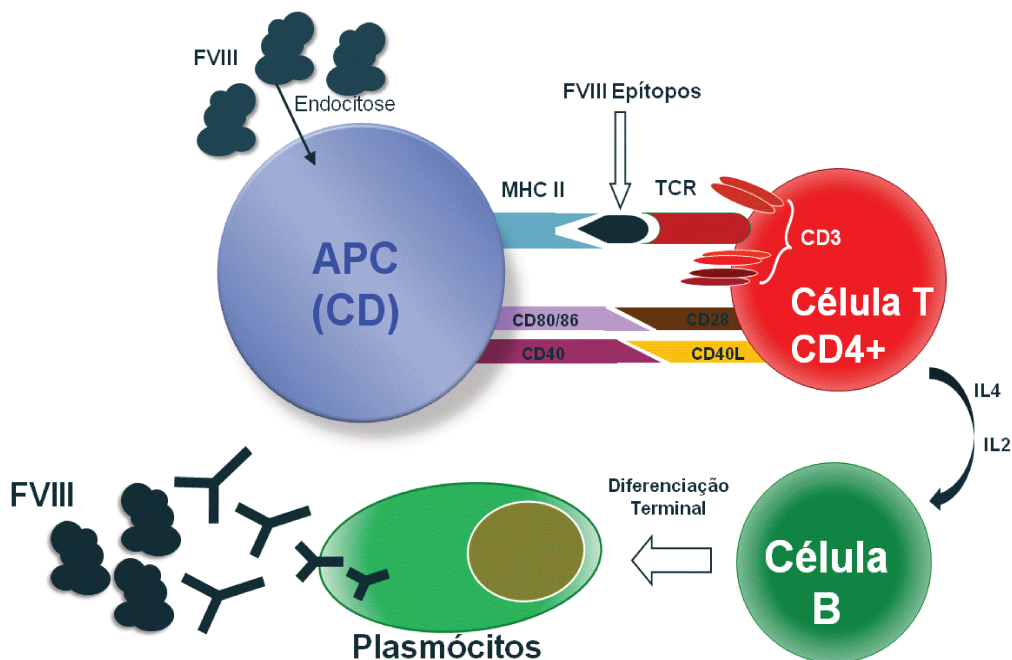


Figura 6. Representação da resposta imune ao FVIII. A resposta imune para o FVIII exógeno envolve um mecanismo de processamento do FVIII fagocitado pela célula apresentadora de antígeno (APC), as células dendríticas (CD), que após degradação do FVIII em pequenos peptídeos os apresenta às células T, via complexo maior de histocompatibilidade (MHC classe II). Desta forma ocorre a interação entre complexo MHC-II/antígeno e célula T através do receptor de células T (TCR) e CD3 (**signal 1**). Simultaneamente, há a interação entre as moléculas co-estimulatórias da APC, (CD80/86 e CD40) e seus respectivos receptores na célula CD4+ (CD28 e CD40L) (**signal 2**). Uma vez ativadas, as células T proliferam, secretam citocinas IL-2(interleucina 2) e IL-4(interleucina 4) (**signal 3**) que ativam as células B, as quais se diferenciam em plasmócitos que produzem anticorpos anti-FVIII.

Os inibidores de FVIII são imunoglobulinas G (IgG) policlonais sendo principalmente da subclasse IgG4. Entretanto, subclasse IgG1 e IgG2 também são usualmente presentes nas populações de anticorpos anti-FVIII (Reding *et al.* 2003). Esses anticorpos inibitórios reconhecem epítomos no FVIII, sobretudo nos domínios A2, C2 e A3 (**Figura 7**). Estas regiões da proteína são críticas, pois são locais no FVIII de ligação do fator X (FX), FIXa, fator de Von Willebrand (FvW) e

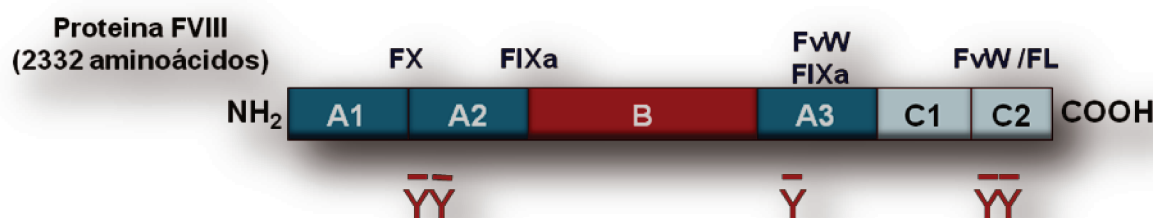


Figura 7. Representação dos domínios do FVIII humano e os principais locais dos epítomos reconhecidos pelos inibidores. Os domínios A2, C2 e A3, possuem os epítomos mais reconhecidos pelos anticorpos inibitórios (representados aqui como: Y).

fosfolipídios (FL).

Quando há a presença do FVIII endógeno, ou seja, indivíduos que não possuem hemofilia A, o FVIII é tolerado imunologicamente, portanto não estimula uma resposta imune. Isso é atribuído a um tipo de tolerância imune central, que ocorre durante o desenvolvimento quando células epiteliais tímicas apresentam os antígenos e uma seleção negativa exclui as células T de alta-afinidade, prevenindo a existência dessas células no sistema imune periférico. Por outro lado, pacientes hemofílicos A terão células T de alta-afinidade específica ao FVIII no sistema periférico e quando esses pacientes receberem infusões de FVIII, o sistema imune reconhecerá como um antígeno estranho e isso desencadeará o evento adverso (Waters *et al.*, 2009). No entanto, isso não explica porque a maioria dos hemofílicos A não desenvolvem inibidores. Desta forma compreender o mecanismo que “protege” esses indivíduos da formação de inibidores pode ser

um caminho para desenvolver o tratamento ou a tolerância ao FVIII nos demais hemofílicos.

Recentemente foi observado que nem todas as células T CD4⁺ são excluídas no sistema imune periférico. Essas células T auto-reativas precisam ser suprimidas, para evitar uma reação imune. As células T regulatórias (T reg) formam uma população de células T, que são CD4⁺, CD25⁺ e Foxp3⁺, presentes no sistema periférico e são responsáveis por suprimir as células T auto-reativas. Quando a apresentação do antígeno acontece na ausência de sinal de “perigo”, as células dendríticas permanecem imaturas e assim quando elas apresentam o antígeno às células T, a população de linfócitos que expande serão células T reg (Waters *et al.*, 2009).

Esse estudo avaliou diferentes fatores genéticos e não genéticos envolvidos no desenvolvimento ou proteção ao desenvolvimento de inibidores entre hemofílicos A ou B no Brasil, com ênfase às características étnicas dos pacientes, incluindo pacientes hemofílicos provenientes das cinco regiões da federação brasileira (Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sul e Sudeste). O entendimento desses fatores de risco ajudará no futuro a determinar um tratamento diferenciado para o controle e sobretudo prevenção do desenvolvimento de inibidores.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

No desenvolvimento deste estudo, foram selecionados pacientes com diagnóstico de hemofilia A ou B, pertencentes a cinco regiões distintas do Brasil, com o objetivo de:

2.1. Objetivo 1. Determinação da prevalência de inibidores e avaliação de fatores de risco genéticos e não genéticos em uma população representativa das diferentes regiões do Brasil. Foram determinadas a prevalência de inibidores contra o FVIII ou FIX, em pacientes com diagnóstico de hemofilia A ou B, com antecedentes étnicos distintos, pertencentes a cinco regiões geográficas do Brasil e correlacionar os fatores genéticos e não genéticos envolvidos na predisposição destes inibidores.

2.2. Objetivo 2. Determinar novos aspectos genéticos relacionados ao desenvolvimento de inibidores, baseado no estudo da expressão gênica de células mononucleares circulantes em pacientes com e sem inibidores. Foram selecionados pacientes irmãos, ou de uma mesma família de irmãos hemofílicos, que fossem discordantes para a presença de inibidores, além de um grupo não relacionado de pacientes com e sem inibidores. Estes casos foram avaliados, utilizando a tecnologia de *cDNA array*, para triagem simultânea de diversos genes que pudessem estar envolvidos no desenvolvimento de inibidores, com ênfase aos genes relacionados a aspectos imunológicos. Em uma segunda fase, os genes selecionados foram individualmente avaliados quanto a intensidade de expressão em cada grupo de pacientes, utilizando a técnica de PCR quantitativo em tempo real.

3. Justificativa

3. JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de inibidores contra o FVIII ou FIX em pacientes hemofílicos compromete consideravelmente o tratamento destes pacientes, aumentando a morbidade e a mortalidade destes casos. Um mecanismo complexo envolvendo diversos aspectos, genéticos e não genéticos, está correlacionado com o surgimento destes inibidores. Entre os fatores de risco previamente descritos estão o tipo de mutação no gene do FVIII ou FIX presente, além de aspectos específicos do sistema imunológico. Muitos destes inibidores se desenvolvem durante a infância e, em estudos anteriores, foi observada uma predisposição maior em determinados grupos étnicos, como hemofílicos de descendência africana e hispânica (Dimichele, 2002). Considerando as características étnicas particulares da população brasileira, composta por uma miscigenação de etnias, incluindo: caucasóides, negros e populações indígenas, acreditamos que entre esses pacientes é possível encontrar diferenças também em aspectos genéticos e imunológicos, que possam contribuir de alguma maneira para o desenvolvimento de inibidores. A determinação dos fatores envolvidos no mecanismo de desenvolvimento dos inibidores é de suma importância e poderá ajudar nas estratégias para a prevenção do aparecimento desses anticorpos, assim como para o desenvolvimento de novas terapias mais efetivas na indução de imunotolerância em pacientes hemofílicos que possuem inibidores.

4. Casuística e Métodos

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Casuística

Foram convidados a participar desse estudo pacientes hemofílicos A e B provenientes de cinco centros distintos, representantes de cada uma das cinco regiões territoriais do Brasil, incluindo o Hemocentro do Acre (Hemoacre), Rio Branco, AC, região Norte; Hemocentro da Bahia (Hemoba), Salvador, BA, região Nordeste; Hemocentro do Mato Grosso (Hemomat), Campo Grande, MT, região Centro Oeste; Hemocentro do Paraná (Hemepar), Curitiba, PR, região Sul e Hemocentro da UNICAMP, em Campinas, SP, região Sudeste.

Para cada caso incluído foi preenchido um questionário de identificação (Anexo 1: Questionário de identificação). Entre os dados demográficos um dos principais critérios analisados nesse estudo foi a definição do grupo étnico, sendo etnia aqui considerada baseada nas características genéticas e fenotípicas, não sendo incorporados aspectos sócio-culturais. Um dos aspectos analisados nesse estudo levou em conta o antecedente étnico dos pacientes. Sendo assim, foi adotado nesse estudo dois critérios entre as informações preenchidas no questionário de inclusão: traços físicos e principalmente a ancestralidade, tendo sido considerado pertencente a etnia negra o paciente que possuía pelo menos um antepassado negro ao longo das três últimas gerações. No caso do grupo indígena, foi considerado antecedente do índio brasileiro o paciente que possuía pelo menos um antepassado indígena ao longo das três últimas gerações e nenhum antepassado negro. No caso do grupo caucasóide, foi considerado o paciente que não possuía antepassados negros ou indígenas ao longo das três últimas gerações.

Foram coletadas amostras de 10,5 mL de sangue total em citrato 3,2%, do qual foi obtido o plasma e 10 mL de sangue periférico em tubo contendo EDTA 10% para o isolamento do DNA à partir de leucócitos usando o método fenol-clorofórmio. As amostras de plasma foram utilizadas para a confirmação e classificação do tipo de hemofilia, pela quantificação da atividade coagulante dos

fatores VIII (FVIII:C) e/ou fator IX (FIX:C), pesquisa da presença de inibidores, além da quantificação e caracterização dos inibidores quando presentes.

O tempo entre a coleta e o processamento da amostra não ultrapassou 1 hora. O sangue total foi centrifugado em 3500 rpm por 15 minutos, preferencialmente a 4º C, e o plasma separado e armazenado em tubos de polipropileno (tipo eppendorf) em alíquotas de 500 µl (mínimo de 3 e máximo de 5 alíquotas). Após alíquotados, os tubos contendo plasma foram congelados imediatamente a -80ºC. Como alternativa, o congelamento rápido por meio da imersão do tubo em uma mistura de gelo seco e álcool e posteriormente armazenado a -80º C, foi utilizado em alguns casos.

Para garantir que a dosagem de FVIII:C e FIX:C se referia ao fator endógeno, foi respeitado um período mínimo de 15 e 30 dias entre a coleta das amostras destinadas a esta análise de FVIII:C e FIX:C, respectivamente e a última infusão de concentrado de fator.

4.2. Confirmação e classificação do tipo de hemofilia

Os testes para a determinação do FVIII:C ou FIX:C foram realizados pela determinação da dosagem funcional em único estágio utilizando plasma comercial deficiente de cada fator (*Factor VIII deficient plasma*, ou *Factor IX deficient plasma* respectivamente, Sigma-Trinity Biotech®, Irlanda). Uma curva de calibração foi determinada utilizando um padrão de referência (Sigma-Trinity Biotech®, Irlanda). Os testes foram realizados no coagulômetro MTX (Coag-A-Mate MTX, Biomerieux-USA). Após a mistura do plasma a ser pesquisado com o plasma deficiente apenas do fator a ser analisado, foi determinado o tempo de atividade da tromboplastina ativada (TTPa), teste que está relacionado ao tempo para a formação da fibrina baseada na presença dos fatores da via intrínseca da coagulação, da qual fazem parte os fatores VIII e IX. O tempo necessário para a formação da fibrina em cada caso é correlacionado à uma curva padrão de calibração sendo possível, desta maneira, se determinar a atividade coagulante

do fator específico. Desta forma a gravidade da Hemofilia foi determinada de acordo com a atividade residual coagulante do FVIII ou FIX. Pacientes com níveis circulantes inferiores a 1% do normal foram classificados com hemofilia grave, pacientes com 1% a 5% foram classificados com hemofilia moderada e pacientes com níveis de 5% a 40% foram classificados com hemofilia leve.

4.3. Pesquisa da presença de inibidores contra o FVIII ou FIX.

A presença de inibidores, ou anticorpos neutralizadores da atividade coagulante do FVIII ou FIX, foi pesquisada pelo teste da mistura do plasma a ser analisado com o pool de plasma normal, incubado por 2 horas a 37°C. Uma amostra com mesmo volume do pool de plasma normal foi incubada em paralelo e utilizada como referência ao teste. O TTPa é realizado na amostra controle e nas amostras a serem pesquisadas. Na presença de inibidores observa-se aumento no TTPa em relação à amostra controle. Quando o teste foi considerado positivo para a presença de inibidores foi realizada a confirmação e quantificação (titulação) do inibidor pela técnica de Bethesda modificada (Verbruggen *et al.*, 1995).

4.4. Quantificação dos inibidores pela técnica de Bethesda modificada.

A quantificação dos inibidores específicos à atividade coagulante do FVIII ou FIX por meio da técnica de Bethesda foi realizada com a mistura de diluições seriadas do plasma a ser analisado com um pool de plasma normal. Após 2 horas de incubação a 37°C foi determinada a atividade residual do FVIII ou FIX.

Por definição, uma unidade Bethesda (UB) inibe 50% da atividade do FVIII ou FIX presente. Desta maneira, os pacientes que apresentam títulos acima de 0,6 em pelo menos uma ocasião foram considerados inibidores positivo sendo que os pacientes com inibidores entre 0,6 UB e 5 UB foram classificados como pacientes com inibidores de baixo título e quando o título foi maior ou igual à 5 UB foram classificados como pacientes com inibidores de alto título.

A diferença entre o método clássico de Bethesda e a técnica de Bethesda modificada ou Nijmegen (Verbruggen *et al.*, 1995) é que no primeiro utiliza-se o

tampão veronal para diluição das amostras e do pool normal e no teste modificado utiliza-se o imidazol, pH 7,4, padronizado para diluição dos plasmas. Como controle é realizada uma diluição 1:1 do pool de plasma normal com plasma deficiente do fator analisado, ou com albumina bovina 4% (BSA). A vantagem da modificação do teste original refere-se a maior sensibilidade para detecção de baixos títulos (**Figura 8**).

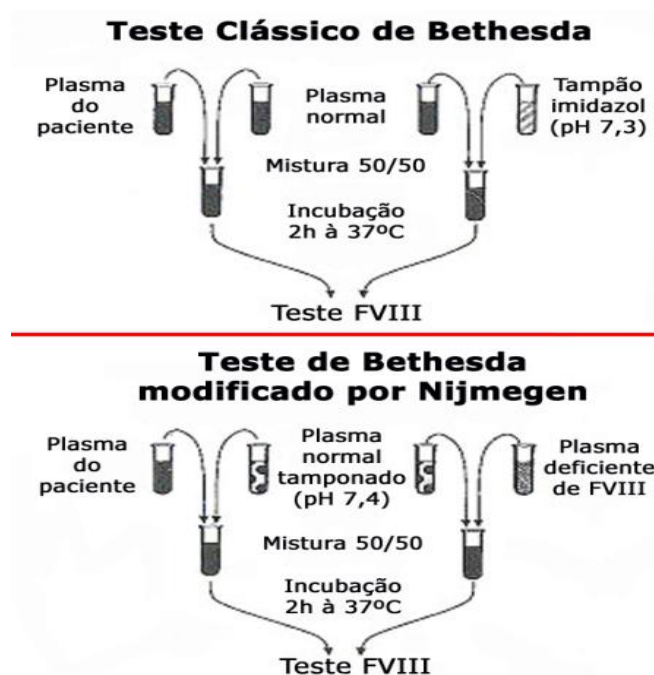


Figura 8. Esquema de comparação entre a técnica de Bethesda clássica e a técnica modificada ou Nijmegen (Verbruggen *et al.*, 1995).

4.4.1. Procedimento da técnica de Bethesda modificada.

As amostras de plasma a serem analisadas foram diluídas utilizando-se o tampão imidazol pH 7,4, nas diluições: 1:2; 1:5; 1:10; 1:20 e 1:40. Simultaneamente, uma amostra de pool de plasma normal foi diluída 1:1 em tampão imidazol, a qual aqui denominada POOL T. As amostras foram preparadas da seguinte maneira:

- a) plasma 1: 2 + Pool T (1:1);
- b) plasma 1: 5 + Pool T (1:1);
- c) plasma 1: 10 + Pool T (1:1);

- d) plasma 1: 20 + Pool T (1:1);
- e) plasma 1: 40 + Pool T (1:1);
- f) Pool T + albumina bovina 4% (1:1) = CONTROLE.

As amostras contendo cada mistura foram incubadas a 37°C por 2 horas e posteriormente, determinou-se a atividade coagulante do FVIII ou FIX de cada diluição. A seguir, realizou-se o cálculo do fator residual de cada mistura, pela fórmula:

Atividade do fator residual (%)	= <u>atividade do fator de cada mistura X 100</u> atividade do fator do CONTROLE
--	---

Encontrada a atividade residual, consideramos as diluições que estiveram entre 25% e 75%. Utilizando-se um gráfico Di-log traçou-se uma curva para encontrar o ponto equivalente a 50% de atividade residual, que corresponde a 1 UB/mL plasma (**Figura 9**).

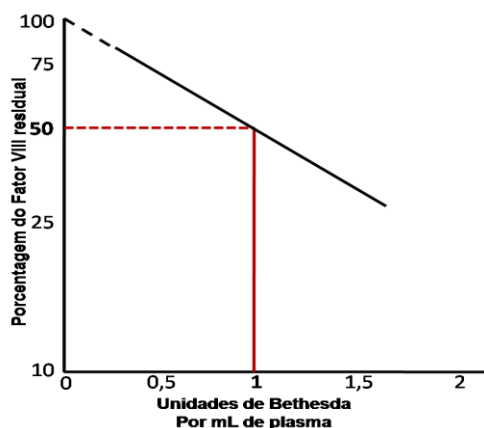


Figura 9. Determinação do título de inibidor correspondente à diluição necessária para se obter 50% da atividade residual do fator.

Caso o valor da primeira diluição seja maior que 50%, utiliza-se a Tabela de conversão, onde o valor encontrado em unidade Bethesda deve ser multiplicado pela diluição do plasma do paciente correspondente ao valor encontrado (Tabela 1).

<i>Fator de conversão x diluição = unidades Bethesda/mL de plasma</i>
--

Tabela 1. Tabela de conversão utilizada para a determinação do título de inibidor (unidade Bethesda).

<i>Atividade Residual do fator (%)</i>	<i>Unidade Bethesda</i>	<i>Atividade Residual do fator (%)</i>	<i>Unidade Bethesda</i>	<i>Atividade Residual do fator (%)</i>	<i>Unidade Bethesda</i>
97	0,05	61	0,70	40	1,35
93	0,10	59	0,75	38	1,40
90	0,15	57	0,80	37	1,45
87	0,20	55	0,85	35	1,50
84	0,25	53	0,90	34	1,55
81	0,30	51	0,95	33	1,60
78	0,35	50	1,00	32	1,65
75	0,40	48	1,05	30	1,70
73	0,45	46	1,10	29	1,75
70	0,50	45	1,15	28	1,80
68	0,55	43	1,20	27	1,85
66	0,60	42	1,25	26	1,90
64	0,65	41	1,30	25	2,00

4.5. Caracterização, pela técnica de ELISA das subclasses de IgG envolvidas, nos casos onde foi detectada a presença inibidor.

A caracterização dos anticorpos específicos contra o FVIII ou FIX foi realizada pelo método descrito por Lindgren e *col.* (2002), baseada na técnica de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Foram realizados três experimentos distintos para cada subclasse de anticorpo analisada, utilizando separadamente três diferentes concentrados comerciais de fator VIII humano derivado do plasma: a) concentrado de FVIII Octavi SD Optimun (Octapharma-França); b) concentrado de FVIII 8Y (Bio Products Laboratory-Reino Unido) e c) concentrado de FVIII Hemofil (Baxter Healthcare Corporation-USA).

A técnica de ELISA utilizada consiste na sensibilização de uma microplaca (96 poços) com 100 µL do concentrado de fator VIII purificado em uma concentração final de 51 U/mL em 0,05 M de tampão carbonato de sódio, pH 9,6, incubando-se a 4°C por 24 horas. Após o período de incubação, a placa foi bloqueada com uma solução contendo 3% de albumina bovina em 0,01 M de tampão fosfato-salina (PBS: 0,137 M de NaCl, 2,68 mM de KCl, 6,8 mM de Na₂HPO₄ e 70,74 mM de KH₂PO₄), pH 7,4, e 0,5% de Tween 20 (Sigma-USA). A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, foram realizadas 3 lavagens com PBS e 0,5% Tween 20 (250 µL por poço). Foram adicionados 50 µL de plasma do paciente positivo para a presença de inibidor, em diluição seriada entre 1:10 a 1:1000 em PBS. Depois de 1 hora de incubação, a placa foi lavada 4 vezes com PBS. Em seguida foram adicionados 100 µL do anticorpo monoclonal secundário anti-humano, conjugado com AP (*alkaline-phosphatase*), tendo sido realizado experimentos separadamente para cada subclasse de anticorpos: IgG1 (*mouse anti-human IgG1 No.:9252-01, SOUTHERN Biotechnology Associates, USA*); IgG2 (*mouse anti-human IgG2 No.:9070-01, SOUTHERN Biotechnology Associates, USA*); IgG3 (*mouse anti-human IgG3 No.:9210-01, SOUTHERN Biotechnology Associates, USA*); IgG4 (*mouse anti-human IgG4 No.:9200-01, SOUTHERN Biotechnology Associates, USA*); IgM (*polyclonal rabbit anti-human IgM ref. A0425, Dakocytomtion, Dinamarca*), diluídos em 50 mM/L de tampão Tris-salina contendo 3% de albumina bovina, sendo incubado por 1 hora em temperatura ambiente. A seguir foram realizadas quatro lavagens com tampão PBS contendo 0,5% de Tween 20. Em seguida, foi adicionado o substrato utilizado para a fosfatase alcalina (p-nitrophenyl phosphate; Zymed®, USA) diluído em 0,09 M de tampão dietanolamina, pH 9,8, contendo 0,05 mM MgCl₂, seguido de incubação por 20 minutos na temperatura ambiente e protegido da luz. A seguir foi acrescentado solução de H₂SO₄ 3M para bloquear a reação. A placa foi então analisada, realizando-se a leitura no comprimento de onda de 405 nm em leitor de microplacas (Sunrise, Tecan-Austria).

Os resultados foram avaliados baseados na maior intensidade obtida em cada análise, sendo Intensidade da reatividade dada de acordo com diluições: + 1:10; ++ 1:40; +++ 1:80 e ++++ 1:320, variando de ++++ até amostra negativa (menor ou igual ao controle negativo: branco).

4.6. Identificação das alterações moleculares relacionadas à hemofilia.

A identificação da alteração molecular associada à hemofilia foi dividida em diferentes estratégias de acordo com o tipo (hemofilia A ou B) e sua classificação (leve, moderada ou grave).

4.6.1. Estratégia para detecção de mutações associadas à hemofilia A.

Para a determinação das alterações moleculares associadas aos casos com diagnóstico de hemofilia A, foi adotada a estratégia de acordo com a Figura 10.

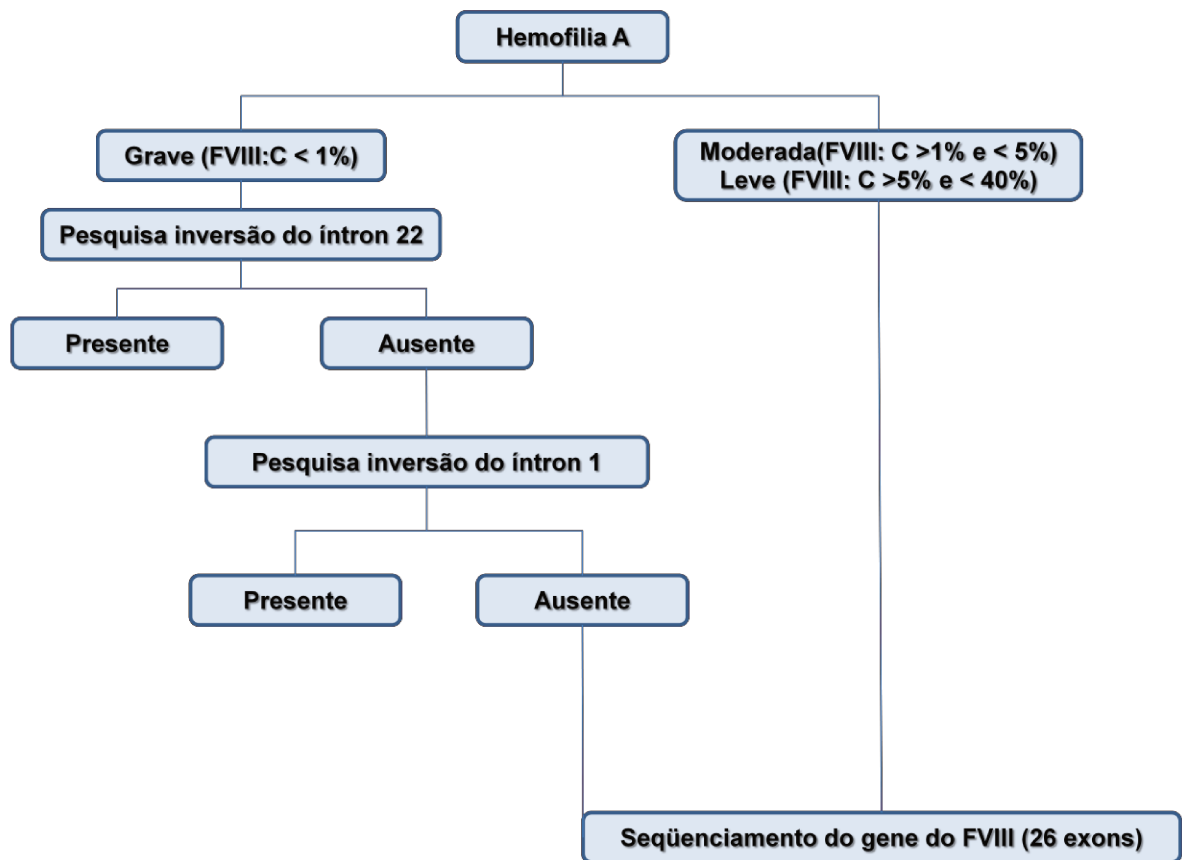


Figura 10. Estratégia para detecção de mutações na hemofilia A. Nos pacientes com hemofilia A grave, inicialmente foram pesquisados a INV- 22, que quando negativa realizou-se a pesquisa da INV-1 no gene do FVIII. Quando ambas inversões foram negativas e para todos os pacientes com HA moderada e leve realizou-se o seqüenciamento de todos os 26 éxons do gene do FVIII.

Cerca de 40% dos casos de hemofilia A classificados como graves (FVIII:C < 1%) são decorrentes de um rearranjo molecular que leva à inversão do íntron 22 do gene do fator VIII (Naylor *et al.*, 1992). Recentemente, Bagnall *et al.*(2002) identificou uma segunda inversão de seqüências do íntron 1 do gene do fator VIII que afeta cerca de 5% dos pacientes com hemofilia A grave. Sendo assim, em pacientes com hemofilia A grave, inicialmente foram pesquisados esses dois rearranjos, ou seja a INV- 22 e INV-1 do gene do fator VIII.

4.6.1.1. Detecção da inversão do íntron 22 do gene do fator VIII.

Para a investigação da INV-22 foram padronizadas em nosso laboratório três técnicas distintas: por ***Southern blot***; pela análise ***subcycling-PCR (S-PCR)*** e a técnica da ***PCR inverso (I-PCR)***. Em alguns casos em que a técnica da I-PCR, que foi utilizada como primeira opção, não foi conclusiva, uma das demais técnicas foi realizada para confirmação da presença ou ausência desta mutação.

4.6.1.1.1. Detecção da inversão do íntron 22 do gene do fator VIII pela técnica de Southern blot.

A primeira técnica descrita para a detecção da INV-22 baseia-se na digestão do DNA genômico pela enzima de restrição Bcl I, seguida da análise por *Southern blot* utilizando a sonda p482.6, correspondente ao *Int22h1* (*American Type Culture Collection – ATCC*, Rockville, MD EUA) (Lakich *et al.*, 1993).

Como essa técnica mostrou-se mais trabalhosa e o resultado mais demorado, utilizamos somente nos casos em que a inversão do íntron 22 não foi possível de ser analisada pelos métodos S-PCR ou I-PCR.

4.6.1.1.1.2. Digestão do DNA genômico a ser pesquisado.

O DNA genômico a ser pesquisado (10 µg), foi digerido com 50 UI da enzima de restrição Bcl I, em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, glicerol 50%, KCl 50 mM, DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM, por 16 horas a 55°C. Após a incubação, o DNA genômico foi concentrado por reprecipitação com acetato de amônio 7 M e etanol absoluto.

4.6.1.1.1.3. Southern Blot

Os produtos de digestão do DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,6%, 7x15 cm de dimensão e 5 mm de espessura, em tampão TAE e a voltagem constante de 40 V por 48 h. O DNA separado em gel foi transferido

para uma folha justaposta de membrana de nylon carregada positivamente (Hybondtm -N⁺, Amersham Life Science, Suécia). A transferência foi feita com método alcalino. O gel foi incubado por 10 minutos em 250 mL de HCl 0,25 N e após este período o gel foi lavado com água destilada e colocado em solução desnaturante (NaOH 0,4 N e NaCl 1 M) por 30 minutos. Montou-se uma plataforma dentro de um reservatório e sobre esta foi colocado uma ponte de papel Whatman 3MM (3 folhas cortadas de tamanho apropriado) saturada com a solução de transferência (NaCl 1,5 M, NaOH 0,25 N). Cortou-se uma membrana (Hybond N) do tamanho do gel e colocou-se a membrana sobre o gel. Três folhas 3MM umedecidas na solução de transferência mais uma pilha de aproximadamente 5 cm de altura de papel de germinação foram colocadas em cima da membrana. O reservatório foi preenchido com a solução de transferência. Sobre a pilha de papel de germinação, um peso de aproximadamente 0,5 – 0,7 kg para géis de 20 x 25 cm foi colocado. A transferência ocorreu por 16 a 24 horas. A membrana foi neutralizada com lavagem em solução da utilização Tris 0,2 M, pH 7,5, 20 x SSC (NaCl 3 M, citrato de sódio 3 mM). O DNA foi fixado na membrana aquecendo-se a 80°C por 2 horas.

4.6.1.1.1.4. Hibridização

Para a hibridização, a sonda foi previamente marcada com α -³²P, com o princípio *random primer*, usando as instruções fornecidas pelo fabricante do kit *Random Primers DNA Labeling system* (Invitrogen-EUA). A remoção dos nucleotídeos não incorporados foi feita utilizando-se microcolunas Sephadex G-50 (MicroSpinTM G-50 Columns, GE Healthcare Bio-Sciences Inc-Canadá) e a atividade específica da sonda marcada foi feita de acordo com o manual do kit *Random Primers DNA labeling system* (Invitrogen, USA). A sonda em uma concentração de 5 ng/mL e com uma atividade específica de 2×10^9 dpm/ μ g, foi previamente desnaturada em uma solução de NaOH 0,2 M a 100°C por 5 min. As membranas com DNA fixado foram submetidas a pré-hibridização em solução contendo PEG 50% (polietileno glicol PM 8000), tampão SSPE 20 x (EDTA 0,02

M pH 7,7; NaCl 3,6 mM, fosfato de sódio 0,2M) e SDS 20% (dodecil sulfato de sódio), por 1 h a 65°C. A hibridização foi feita com a mesma solução de pré-hibridização, onde se acrescentou a sonda F8A preparada que reconhece o gene F8A. A membrana foi hibridizada por 16 h a 65° e após hibridização, a membrana foi submetida a lavagens com solução de baixa estrigência (SSC 2x e SDS 0,1%) duas vezes por 15 min. As membranas foram expostas em filme raio-X por 24h (Figura 11).

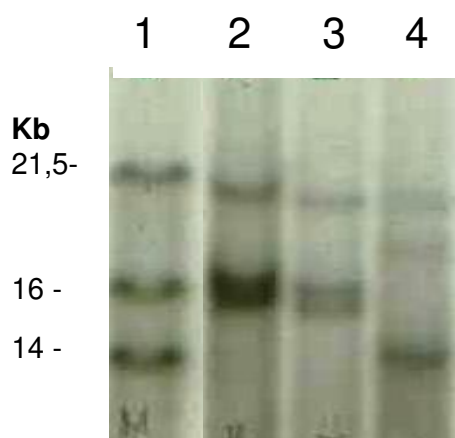


Figura 11. Estratégia para detecção da INV-22 por *Southern blot*. Filme de raio-x da membrana hibridizada com a sonda correspondente ao gene F8A pela técnica de *Southern blot*. O DNA genômico de cada indivíduo foi digerido com a enzima Bcl-I. 1-indivíduo sem a INV-22; 2-3. paciente hemofílico com INV-22 do tipo proximal; 4- paciente hemofílico com INV-22 do tipo distal. A presença dos fragmentos de 21,5 Kb, 16 Kb e 14Kb determina a ausência da INV-22.

4.6.1.1.2. Detecção da inversão do íntron 22 do gene do fator VIII pela técnica de Subcycling-PCR (S-PCR).

Liu & Sommer (1998) descreveram a análise da inversão do íntron 22 pela técnica de S-PCR (*subcycling-PCR*). Nesta técnica quatro primers são utilizados, aqui chamados de: P, Q, A, B (Tabela 2). Os primers P e Q correspondem respectivamente às extremidades 5' e 3' da região *Int22h1*. Os primers A e B, são específicos para as extremidades 5' e 3' da região *Int22h2* e *Int22h3*. Os primers P e Q anelam em distâncias diferentes do A e B, assim após a amplificação três

padrões eletroforéticos podem ser observados: PQ (12 Kb), AB (10 Kb) e na presença da inversão a banda PB + AQ (11 Kb cada) (Figura 10).

Tabela 2. Primer utilizados na técnica de S-PCR.

Primer	Seqüência 5' - 3'
P	GCC CTG CCT GTC CAT TAC ACT GAT GAC ATT ATG CTG AC
Q	GGC CCT ACA ACC ATT CTG CCT TTC ACT TTC AGT GCA ATA
A	CAC AAG GGG GAA GAG TGT GAG GGT GTG GGA TAA GAA
B	CCC CAA ACT ATA ACC AGC ACC TTG AAC TTC CCC TCT CAT

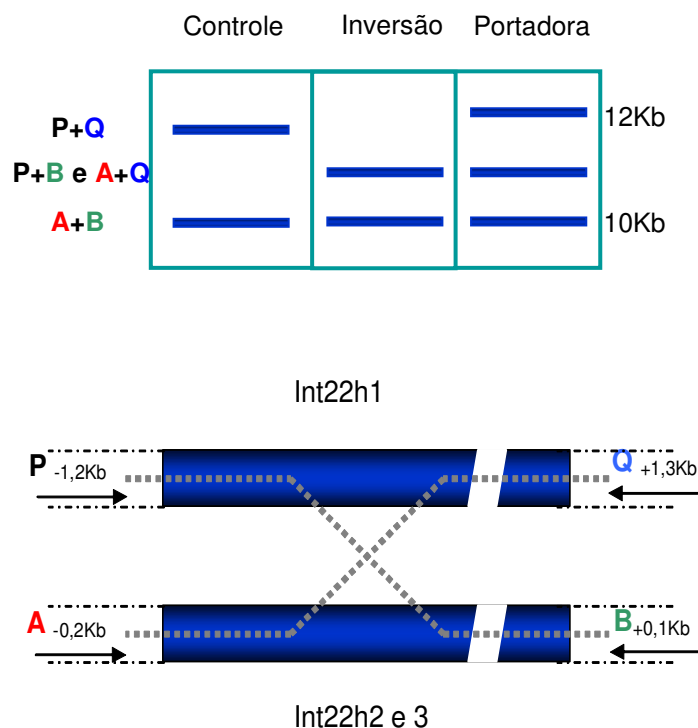


Figura 12. Representação das seqüências homólogas do íntron 22 e localização dos primers utilizados conforme técnica S-PCR. O produto de PCR produz três padrões de bandas possíveis. A banda PQ (12 Kb) aparece no alelo sem a inversão íntron 22 e a banda PB + AQ (11 Kb) quando a inversão está presente. A banda AB sempre é produzida, pois no mínimo uma cópia do *Int22h2* e 3 estará intacta.

A PCR foi realizada a partir de 250 ng de DNA genômico, com a mistura: 25µL de Tris-HCl 50mM, pH 9,2; 2,25mM MgCl₂; 16 mM (NH₄)₂SO₄; 7,5% DMSO; 500µM de dGTP e deaza-dGTP (1:1); 500µM de cada dNTP; 2,5 U da enzima Elongase (Gibco) e 0,2 µM de cada primer (P+Q+A+B). A reação foi submetida as

condições de ciclos estabelecidas para S-PCR: desnaturação a 94°C 120"; dez primeiros ciclos: 94°C 12", seguido de quatro subciclos de anelamento/elongamento (4x 60°C por 120" e 65°C por 120"); demais 20 ciclos: 94°C 12", seguido da adição de 3" por ciclo de cada passo de anelamento/elongamento (60°C 120+3" e 65°C 120+3"). A análise das amostra foi realizada em gel de agarose 0,6% por aproximadamente 5 horas a 90V (Figura 6).

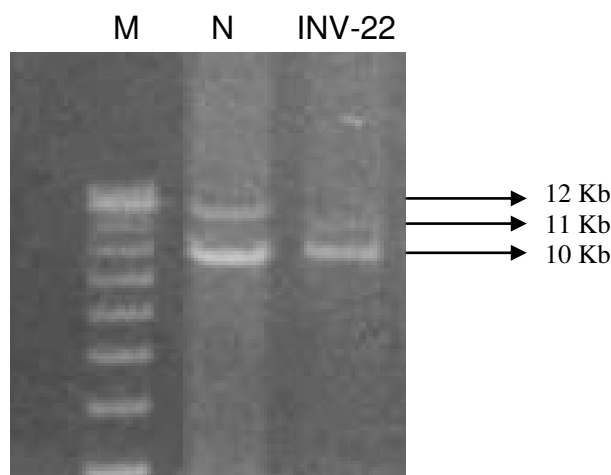


Figura 13. Detecção da inversão do íntron 22 do gene do fator VIII através da técnica de S-PCR. Eletroforese em gel de agarose 0,6%, onde a presença da inversão do íntron 22 pode ser confirmada pela presença de uma banda de 11 Kb e ausência da banda de 12 Kb conforme observado na amostra positiva para INV-22 (INV-22) e o oposto é observada na amostra negativa para INV-22(N) onde ocorre a presença de uma banda de 12 Kb e ausência da banda de 11 Kb. M, marcador de peso molecular 1 Kb.

4.6.1.1.3. Detecção da inversão do íntron 22 do gene do fator VIII pela técnica de PCR inverso (I-PCR).

A terceira técnica descrita por Rossetti *et al.* (2005) baseia-se na técnica do I-PCR, no qual o DNA genômico é digerido e posteriormente adiciona-se *T4 DNA ligase* para a formação de um DNA circular, B-rings (*self-ligated BclI fragments*), e finalmente submetido a uma reação de PCR contendo três primers específicos para a detecção da inversão(Figura 14).

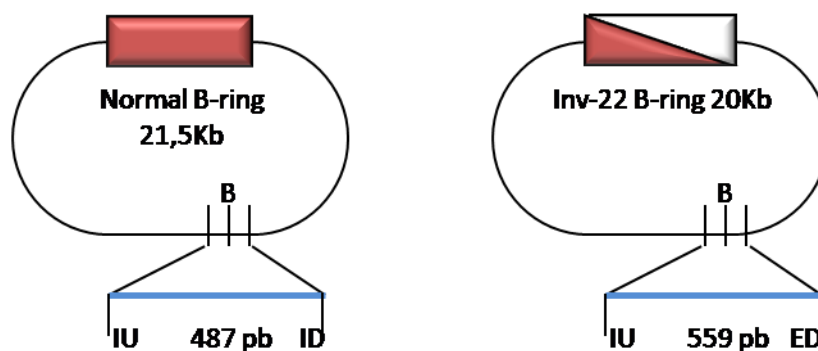


Figura 14. Esquema da I-PCR para análise da INV-22. Dois *B-rings* (fragmentos gerados pela digestão com a enzima BclI e posteriormente ligados pela enzima T4 ligase) são descritos: à esquerda, um anel de 21,5 kb que corresponde a uma cópia sem a INV-22 (*B-ring* normal); direito, um anel de 20 kb que corresponde a uma cópia com a INV-22 (*B-ring* alterado). Cada anel é especificamente reconhecido por uma amplificação por PCR específica (parte inferior do painel). Detalhes do PCR: *B-ring* normal gera um fragmento de 487 pb com os primers UI e ID; *B-ring* com a INV-22 gera um fragmento de 559 pb com os primers UI e ED. Locais de cada primer, o sítio de reconhecimento da enzima BclI (B) e os tamanhos dos fragmentos da PCR são indicados. (Figura baseada em Rossetti *et al.* 2005).

O S-PCR demonstrou ser uma técnica rápida cujo resultado é obtido em 24 horas, no entanto sua reprodutibilidade não é alta e há a necessidade de grande concentração de DNA. Por este motivo passamos a utilizar a técnica do I-PCR pela qual obtivemos resultados em 24 horas com grande reprodutibilidade. A técnica do I-PCR iniciou-se com a digestão de 1-2 µg de DNA genômico com 10 unidades da enzima Bcl-I durante um período de 4 horas a 55°C. Este período não deve se estender por muito tempo para evitar a perda das terminações coesivas geradas pela enzima. Após o período de incubação, o DNA foi extraído com 200 µL de fenol e 200 µL de clorofórmio / álcool isoamílico (1:24) e centrifugado por 5 min. a 12.000 rpm, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA precipitado com 500 µL de etanol absoluto e 0,3M de NaCl. A extração pode ser feita com kit GFX (Amersham Biosciences, England, UK). O DNA circular contendo parte do gene do FVIII foi sintetizado utilizando-se 5U da enzima T4 DNA ligase (Fermentas International Inc., Canadá) com incubação a

15°C durante 16 horas. Após o período de incubação o DNA, foi extraído conforme a técnica do kit GFX, ressuspendendo-o em 30 µL de água. 6 µL desta solução foram utilizados para realização da PCR com a mistura: 2,5 µL de buffer; 1,5 mM MgCl₂; 0,5mM de cada dGTP; 2,5 U da enzima Taq polimerase e 1,5 mM de cada primer (Tabela 3). Após 5 minutos de desnaturação à 94°C, a reação foi obtida com 35 ciclos: 94°C 30", 55°C por 60", 72°C por 90". A reação foi analisada com eletroforese em gel de agarose 1% a 100V. Os fragmentos de 559pb indicam a presença da inversão do íntron 22 e os fragmentos de 487 pb a ausência (Figura 15).

Tabela 3. Seqüência de primers utilizados na I-PCR.

Primer	Seqüência 5' - 3'
IU (Intragenic Upstream)	CCTTTCAACTCCATCTCCAT
ID (Intragenic Downstream)	ACATACGGTTTAGTCACAAGT
ED (Extragenic Downstream)	TCCAGTCACTTAGGCTCAG

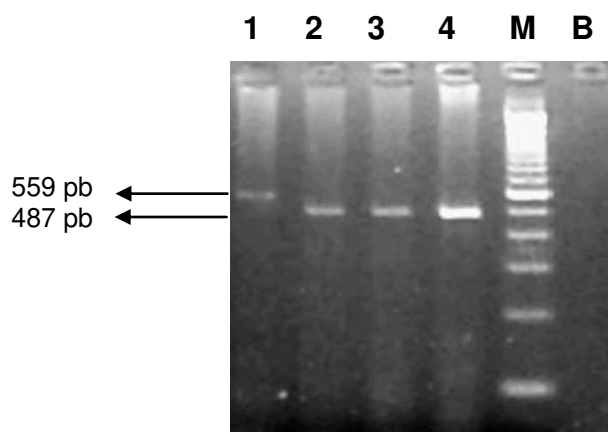


Figura 15 Detecção da inversão do íntron 22 do gene do fator VIII pela técnica de PCR inverso (I-PCR). Eletroforese em gel de agarose 0,6%, onde a presença da inversão do íntron 22 pode ser confirmada pela presença de uma banda de 559 pb (1: pacientes com a inversão do íntron 22) e na ausência da inversão observa-se apenas uma banda de 487 pb (2, 3 e 4: paciente hemofílico sem inversão). M: marcador de peso molecular de 100pb, B: branco da reação(reação sem amostra de DNA).

4.6.1.2. Detecção da inversão do íntron 1 do gene do fator VIII.

A análise para a inversão do íntron 1 foi realizada por meio de duas reações de PCR (Bagnall *et al.*, 2002). Essa técnica tem como vantagem ser rápida e simplificada. A Tabela 4 relaciona os primers utilizados.

Tabela 4. Primers para análise da inversão do íntron 1.

Primers	Seqüência (5'- 3')
9cR	CTA GCT TGA GCT CCC TGT GG
9F	GTT GTT GGG AAT GGT TAC GG
Int1h-2F	GGC AGG GAT CTT GTT GGT AAA
Int1h-2R	TGG GTG ATA TAA GCT GCT GAG CTA

As reações de PCR foram realizadas a partir de 100 ng de DNA genômico, em 25 µL de reação contendo: 2,5µL tampão da enzima Taq polimerase (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) 1,5 mM MgCl₂; 5% DMSO; 0,5mM de cada dNTP; 2,5 U da enzima Taq polimerase e 0,2 mM de cada primer sendo:

- *Int1h-1*: primers 9F + 9cR + *int1h-2F*
- *Int1h-2*: primers *int1h-2F* + *int1h-2R* + 9F

Após 2 minutos de desnaturação a 94°C, a reação foi obtida com 30 ciclos de: 94°C 30", 65°C por 30", 72°C por 120". A presença da inversão íntron 1 gera uma banda de 1,323 Kb na presença dos primers *Int1h-1* e de 1,776 Kb na presença primers *Int1h-2*, conforme representado nas Figura 16 e Figura 17.

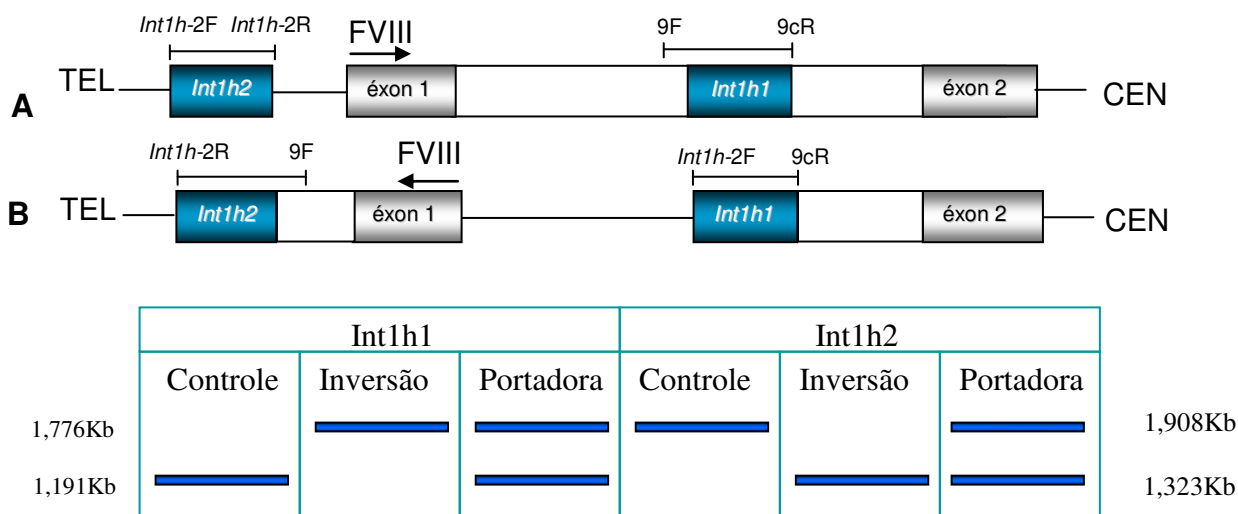


Figura 16. Representação da inversão do íntron 1 do gene fator VIII. Diagrama normal (A) e na presença da inversão do íntron 1 (B). A amplificação de *Int1h-1* (9F + 9cR + *int1h-2F*) gera no controle normal uma banda com 1,191 kb e na presença da inversão uma banda com 1,776 kb. Ao contrário, a amplificação de *Int1h-2* (*int1h-2F* + *int1h-2R* + 9F) gera no controle normal uma banda com 1,908 kb e com a presença da inversão uma banda com 1,323 kb.

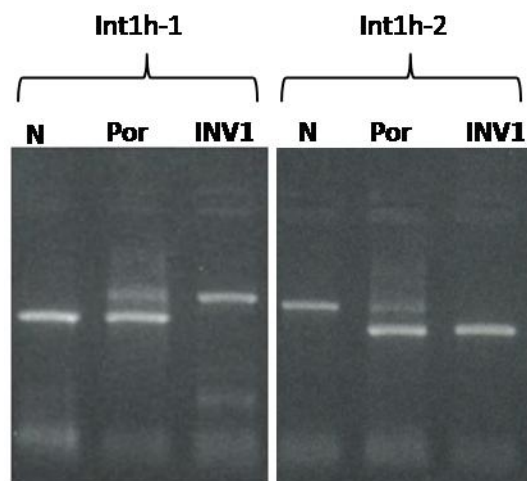


Figura 17. Detecção da inversão do íntron 1 do gene do fator VIII. Eletroforese em gel de agarose 0,6%, onde a presença da inversão do íntron 1 pode ser confirmada pela presença das bandas de 1,776 Kb(Int1h-1) e 1,323Kb(Int1h-2); a ausência das bandas de 1,191 Kb(Int1h-1) e 1,908Kb(Int1h-2), conforme observado nas amostras de paciente com inversão do íntron 1 (INV1) e de portadora da inversão do íntron 1 do gene do fator VIII (Por). N, controle normal.

4.6.1.3. Determinação da mutação associada à hemofilia A por seqüenciamento automático do gene do fator VIII.

Para os casos de hemofílicos A grave que apresentaram resultados negativos para as inversões do íntron 22 e íntron 1 e para todos os casos de hemofilia A moderada e leve, regiões específicas do gene do fator VIII foram avaliadas por de seqüenciamento automático. Nesse caso os produtos de PCR são realizados a partir de 100 ng de DNA genômico isolado de leucócitos, com a mistura: 25µL de buffer da enzima Taq polimerase; 1,5 mM MgCl₂; 0,5mM de cada dGTP; 2,5 U da enzima Taq polimerase e 0,2 mM de cada primer conforme descrito na Tabela 5.

Após a amplificação das regiões específicas do DNA pela técnica de PCR, 50 µL produto amplificado foi purificado, utilizando-se um kit, *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences, England, UK). O produto purificado foi quantificado em gel de agarose com marcador de quantificação (*Low DNA Mass Ladder*, Califórnia, EUA) para avaliar a concentração do produto amplificado. Em seguida, foi realizada a reação de seqüenciamento, utilizando o *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Perkin Elmer Applied Biosystem, CA, EUA), de acordo com instruções do fabricante, para posterior eletroforese em seqüenciador automático (ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer. Perkin Elmer Applied Biosystem, CA, EUA) e análise das seqüências.

Tabela 5. Relação de primers para seqüenciamento do gene do fator VIII.

Éxon	¹ Seqüência (5'-3')	Fragmento (pb)	² T. °C	Éxon	¹ Seqüência (5'-3')	Fragmento (pb)	² T. °C
1	GCTCCTGTTCACTTTGACTT AGCATCCACAACCATCCTAAC	608	56	14A	GAGAACCTCTAACAGAACGT CTGTTGGACCATTTCCATGT	1252	56
2	TGAAGTGTCCACCAAAATGA TACCCAATTCATAAATAGC	207	56	14B	ATGCTACAGCTTTGAGGCTA AGATGAGAAGAGTTGTCTTG	1085	56
3	GTAATATCCCCAAGTAACCT TATTCATAGAATGACAGGAC	208	56	14C	ATTGCAAAGGTATCATCATT AGCAGAGCAAAGGAATAACC	1029	56
4	ACAGTGATATAGAAAGGAC TGCTTATTCATCTCAATCC	295	56	15	CACCTAGGAAAAATGAGGATG AGTGGGAATACATTATAGTC	314	56
5	CTCCTAGTGACAAATTCCTA AGCAGAGGATTCTTTCAGG	187	56	16	AGCATCCATCTTCTGTACCA TTGCACGTAGGATAAATATC	456	56
6	CATGAGACACCATGCTTAGC CTGGTGCTGAATTTGGAAGA	220	56	17-18	AATCCACTCTGGTTCATAGG ACTGATTGTGTTCCCAAGTGC	778	56
7	TCAGATTCTCTACTTCATAG GAAACTGTGCAAGGTCCATC	225	56	19	GCAAGCACTTTGCATTTGAG GCTGAGTAGGTAGGGAACCT	197	56
8	CTCTGGTATAGGACAGCCTA AGAGAGGTACAATAGTCAAA	356	56	20	TTGTGCACTCTAGTTACTGT ATAATCAGCCCAGGTTCTTG	155	56
9	AGAGTTGGATTGAGCCTAC CAGACTTTTTCTTCTTACCT	284	56	21	GACTAACCAGCTGAATTTA GAGTGAATGTGATACATTTT	181	56
10	AGCCTCAAATTACTATAATG ACTTTAGACTGGAGCTTGAG	347	58 + DMSO	22	TCAGGAGGTAGCACATACAT GTCCAATATCTGAAATCTGC	288	56
11	CATGATTATCAATATGTGGC GGATCCGACATACACTGAGA	334	56	23	CTCTGTATTCACTTTCCATG GATATTGGATGACTTGGCAC	214	56
12	CTAGCTCCTACCTGACAACA GACATCACTTTGATTACATC	283	56	24	GCTCAGTATAACTGAGGCTG CTCTGAGTCAGTTAAACAGT	249	56
13	CATATAATAATTCCTAATTG AGAGCATACGAATGGCTAGT	368	53	25	GAATTTCTGGGAGTAAATGG GCTTACCTTTACTTTGCCAT	322	56
				26	ACTGGAACAACCTAGAAGTG TTAGCACAAAGGTAGAAGGC	317	57 + DMSO

1. Seqüência conforme Arruda e col. (1995).

2. Temperatura de hibridização.

4.6.1.4. Frequência dos haplótipos do gene do FVIII

A genotipagem para os SNPs R484H, R776G, M2238V e D1241E do gene do FVIII, que determinam os haplótipos H1, H2, H3, H4, H5 e H6 do FVIII, conforme descritos por Viel *et al.* (VIEL, *et al.*, 2007) foi realizada por seqüenciamento direto do DNA genômico do FVIII. Os *primers* utilizados foram os mesmos descritos na Tabela 5, sendo eles: éxon 10 (R484H), éxon 14(R776G e D1241E) e (M2238V) .

4.6.2. Estratégia para detecção de mutações associadas à hemofilia B.

Em contraste com as mutações no gene do FVIII, não há nenhuma mutação de elevada prevalência no gene do FIX para direcionar um programa de rastreamento inicial dos casos de hemofilia B. Desta forma a análise por seqüenciamento direto do DNA genômico do FIX, pareceu ser a melhor estratégia. Os *primers* utilizados para a análise do gene do fator IX estão relacionados na Tabela 6. As técnicas empregadas são as mesmas descritas para o seqüenciamento do fator VIII, anteriormente descritas.

Tabela 6. Seqüências dos primers utilizados na amplificação das diferentes regiões do gene do fator IX

Região	Primers	Seqüência (5'-3')	Posição ¹	Produto	T. Hibrid. ²
A	promotor	TCACTTGTCCCAAGAGGCCA	-115 A –96	271 pb	60°C
	éxon 1	GGCAAGCATACTCAATGTAT	156 A 137		
B	éxon 2,3	AAGACTTTCTTAAGAGATGT	6246 a 6265	499 pb	56°C
	íntron 2	ATATGTTTCATATATTAGCT	6745 a 6726		
C	éxon 4-F	GCATTCTAAGCAGTTTACGT	10342 a 10361	209 pb	60°C
	éxon 4-R	CAGAGGGAAACTTTGAACCA	10551 a 10532		
D	éxon 5-F	GCATGTAAATGATGCTGTT	17626 a 17645	225 pb	60°C
	éxon 5-R	ATGCTGAAGTTTCAGATACA	17851 a 17832		
E	éxon 6-F	GTTCCATTTGCCAATGAGAA	20308 a 20327	310 pb	60°C
	éxon 6-R	CCTGTGTCTTGCCAGCTGAGC	20618 a 20598		
F	éxon 7-F	TGTATTATGCAGTAAGAGTC	30001 a 30020	194 pb	58°C
	éxon 7-R	AGCTAGTGGTGCTGCAGATT	30195 a 30176		
G	éxon 8-F	TCTGTGTATGTGAAATACTG	30769 a 30788	662 pb	60°C
	éxon 8-R	GTTAGTGAGAGGCCCTGTTA	31431 a 31412		

1. Número de acordo com Yoshitake e col. (1985)

2. Temperatura de hibridização

4.7. Extração de RNA a partir de células mononucleares sangüíneas

4.7.1. Separação das células mononucleares circulantes

As amostras de RNA dos pacientes foram extraídas a partir de células mononucleares circulantes. O método de isolamento de células mononucleares a partir de amostras de sangue total utilizou uma mistura de polissacarídeos de alto peso molecular, o reagente Ficoll-Paque Plus® (Amersham Biosciences), descrito por Boyüm (1968).

Amostras com 20 mL de sangue total, coletado com anticoagulante EDTA, foi cuidadosamente transferido para um tubo de polipropilenol de 50 mL contendo um volume de 15 mL de Ficoll-Paque Plus. Após a centrifugação a 1.500 rpm por 30 minutos foi possível visualizar a formação de três fases bem distintas. Na fase superior encontra-se o plasma, na interfase, entre a fase superior e a fase

intermediária encontram-se as células mononucleares, em seguida o Ficoll-Paque Plus e logo após a mistura de eritrócitos e granulócitos (Figura 18).

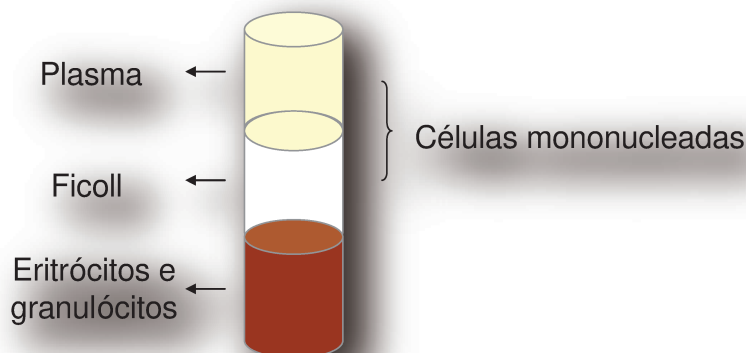


Figura 18. Ilustração da formação de três fases para a separação de células mononucleadas. Foi utilizado nesse processo o método de separação por do reagente Ficoll-Paque Plus.

A fase contendo o plasma foi descartada para facilitar a coleta das células mononucleadas sendo estas transferidas para um novo tubo. O excesso de Ficoll-Paque Plus foi removido e as células foram ressuspensas gentilmente em três vezes o seu volume de tampão fosfato-salina (PBS) (136,7mM NaCl; 2,68mM KCl; 8,1mM Na₂HPO₄ e 1,46mM KH₂PO₄) seguindo-se a centrifugação a 1.500 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante prosseguindo com preservação das células com *RNAlater RNA Stabilization Reagent®* (QIAGEN), que dispensa a necessidade de congelamento das células, sem prejudicar a posterior extração do RNA.

4.7.2. Extração do RNA de células mononucleares circulantes

A solução formada pelas células mononucleares suspensas no reagente do *RNAlater RNA Stabilization Reagent®* (QIAGEN), foi centrifugada a 2.000 rpm por 5 minutos e o reagente foi removido. O *pellet* de células formado foi então utilizado para extração do RNA pelo Kit RNeasy® (QIAGEN, USA). Este kit baseia-se na utilização de uma solução tampão contendo isotiocianato de guanidina que promove a desruptura celular, com posterior adição de etanol, o

qual promove condições para uma ligação seletiva do RNA a uma membrana de sílica-gel. Uma vez o RNA estando ligado à membrana basta a eluição com água livre de RNase para recuperação do RNA altamente purificado.

A concentração do RNA foi determinada no aparelho NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (NanoDrop Technologies, USA) com valor padrão, 1 ABS 260nm = 40 µg/ml de RNA e o grau de pureza pela relação ABS 260/280nm, que deve estar na faixa de 1,8-2,1.

A qualidade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose contendo o agente desnaturante formaldeído, eliminando desta forma o efeito das estruturas secundárias. A amostra de RNA foi diluída em uma solução tampão contendo 6,5 % de formaldeído, 50% de formamida deionizada, 5% de Ficoll-Paque Plus e, posteriormente, carregada no gel. A eletroforese foi realizada com um tampão de corrida contendo 0,1M de 3-(n-morpholino) propan sulfonic acid (MOPS), 0,05 M EDTA, pH 8,0, e 0,3M CH₃COONa em uma cuba previamente tratada com H₂O₂ 3% para evitar possível degradação do RNA. O gel visualizado em transluminador ultravioleta deve apresentar as bandas 18S e 28S bem distintas para demonstrar a qualidade do RNA (Figura 19).

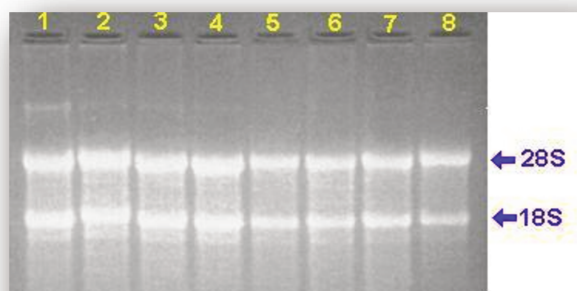


Figura 19. Análise da qualidade do RNA extraído. Eletroforese em gel de agarose 0,8% com agente desnaturante formaldeído. Amostras dos pacientes 1-8 apresentando as bandas 18S e 28S.

4.8. CodeLink bioarrays

Para a triagem simultânea de diversos genes foi utilizado a plataforma *CodeLink Human Whole Genome Bioarrays* (Amersham Biosciences Piscataway, USA) que é constituída por 55.000 oligonucleotídeos derivados de genes

humanos depositados no GenBank, Unigene e RefSeq. Cada slide possui ainda 380 negativos assim como 360 seqüências bacterianas como controles positivos.

Para cada paciente selecionado foi hibridizado um *bioarrays*, sendo utilizada como sonda o RNA extraído de células mononucleadas a partir de sangue total. Após a hibridização os *bioarrays* foram scaneados e analisados pelo programa GenePix Pro (Molecular Devices, USA) e CodeLink.

4.8.1. Preparação das amostras de cDNA e subsequente cRNA para hibridização nos *bioarrays*.

4.8.1.1. Síntese do cDNA

Para síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA) foi preparado uma solução contendo 6 diferentes RNAm bacterianos (0,1pg/uL de *araB*, *entF*, *fixB*, *gnd*, *hisB* e *leuB*) que serviram para controle da marcação da sonda, hibridização da lâmina e sensibilidade do experimento. Para cada amostra foi montado um experimento que continha: 1µg de RNA extraído do paciente; 1µL de RNAm controle bacteriano (0,6 pg), 1uL T7 Oligo (dT) primer (5 mM) e o volume foi completado com água livre de nuclease para um volume final de 12 µL. A reação foi incubada a 70°C por 10 minutos para eliminar possíveis estruturas secundárias e imediatamente colocado no por gelo 3 minutos. Foram adicionados 2 µL de tampão da primeira fita 10X; 4 µL de dNTP Mix 5 mM; 1 µL de inibidor de RNase e 1 µL de transcriptase reversa. A reação foi incubada a 42°C por 2 horas.

Para síntese da segunda fita de cDNA foram adicionados 63 µL de água livre de nuclease, 10 µL do tampão da segunda fita, 4 µl de dNTP Mix 5mM, 2 µL DNA polimerase e 1µL de RNase H. As amostras foram incubadas a 16°C por 2 horas.

4.8.1.2. Purificação da dupla-fita de cDNA

Para purificação do cDNA utilizou-se o kit *iPurify cDNA and cRNA®* (GE Healthcare Companies, USA) que se baseia na ligação do DNA a uma sílica-gel em presença de um solução de alta concentração de sal. O cDNA é recuperado com a adição de 20 µL de água livre de nuclease.

4.8.1.3. Síntese da sonda biotinilada de cRNA

A síntese do RNA complementar (cRNA) foi realizada com a adição de 12 µL de biotina-NTP mix, 4 µL do tampão da enzima T7 10X e 4 µL do mix da enzima T7 às amostras de dupla fita de cDNA. A solução foi então incubada por 14 horas a 37°C em uma estufa de hibridização.

4.8.1.4. Purificação da dupla-fita de cRNA

Para a purificação do cRNA também foi utilizado o kit *iPurify cDNA and cRNA®* (GE Healthcare Companies, USA) sendo o cRNA recuperado com a adição de 100 µL de água livre de nuclease. Sendo a alta qualidade do cRNA crítica para um experimento preciso e reprodutivo as amostras foram analisadas no aparelho NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (NanoDrop Technologies, USA) tendo como valor padrão estabelecido, 1 ABS 260nm = 40 µg/ml de RNA e o grau de pureza determinado pelo valor da razão ABS 260/280nm, que deveria estar na faixa de 1,8-2,1. A integridade do cRNA foi verificada em gel desnaturante de agarose usando como controle uma amostra de RNA total.

4.8.1.5. Fragmentação do cRNA

Para a fragmentação do cRNA, 10 µg da amostra de cRNA foram misturadas com 5 µL de tampão de fragmentação (CodeLink Gene Expression System-GE, USA) e o volume total de 25 µL completado com água livre de nuclease e incubado a 94°C por 5 minutos. Posteriormente foram adicionados 78 µL de tampão de hibridização componente A (CodeLink Gene Expression System-GE, USA), 130 µL de tampão de hibridização componente B (CodeLink Gene

Expression System-GE, USA) e completados para 260 μ L com água livre de nuclease. A reação foi incubada a 90°C por 5 minutos e imediatamente refrigerada em gelo por um período de 5-30 minutos.

4.8.2. Hibridização dos *bioarrays*

Um total de 250 μ L da reação obtida com a fragmentação do cRNA foi injetado em cada *bioarray* e estes foram selados com adesivos próprios para evitar evaporação. Os *bioarrays* foram hibridizados em uma incubadora a 37°C e agitação constante de 300 rpm por 19 horas.

Após este período, os adesivos que protegiam as câmaras de hibridização de cada *bioarray* foram removidos e cada *bioarray* foi posto em um reservatório contendo tampão TNT 0,75X (0,075 M Tris-HCl, pH 7,6; 0,11 M NaCl e 0,037% Tween-20) a temperatura ambiente. Posteriormente, os *bioarrays* foram transferidos para um novo reservatório contendo tampão TNT 0,75X pré-aquecido a 65°C e mantido nesta temperatura por exatamente 1 hora. Imediatamente os *bioarrays* foram transferidos para um reservatório contendo Cy5-estreptavidina (2 μ g/mL) e 3,4 mL de tampão TNB (0,1M Tris-HCl-pH 7.6; 0,15M NaCl e 0,5% do reagente de bloqueio NEM (PerkinElmer-USA)) e incubados em temperatura ambiente por 30 minutos. Para evitar a degradação do fluoróforo, o reservatório foi protegido da luz. Os *bioarrays* foram então submetidos a um série de 4 lavagens em solução de TNT 1X (0,1 M Tris-HCl, pH 7,6; 0,15 M NaCl e 0,05% Tween-20) com duração de 5 minutos cada, e uma vez em solução SSC 0,1X (NaCl 3M e $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) e 0,05% Tween-20 com duração 30 segundos e imediatamente secos por centrifugação a 2.000 rpm por 3 minutos e mantidos protegidos da luz até o escaneamento.

4.8.3. Escaneamento dos *bioarrays*.

Os *bioarrays* foram scaneados no scanner GenePix 4.000B (Molecular Devices, USA) seguindo os parâmetros estabelecidos pelo fabricante (wavelength: 635 nm; PMT voltage: 600 V; laser power: 100%; pixel size: 5 μ m e locus position 0 μ m). Os dados gerados pela intensidade de cada *spot* foram

coletados pelo programa GenePix Pro (Molecular Devices, USA) (Figura 20). Após a coleta o programa invalidou automaticamente os *spots* irregulares. O programa CodeLink normalizou os resultados com relação a mediana e analisou os controles positivo e negativos verificando se esses apresentaram resultados esperados.

O fabricante recomenda que para *bioarrays* de genoma completo a quantidade de *spots* L (próximo ao *background*) esteja entre 30% a 60% do valor total e que a quantidade de *spots* C (contaminados), I (irregulares) e S (saturados) seja menor que 1%.

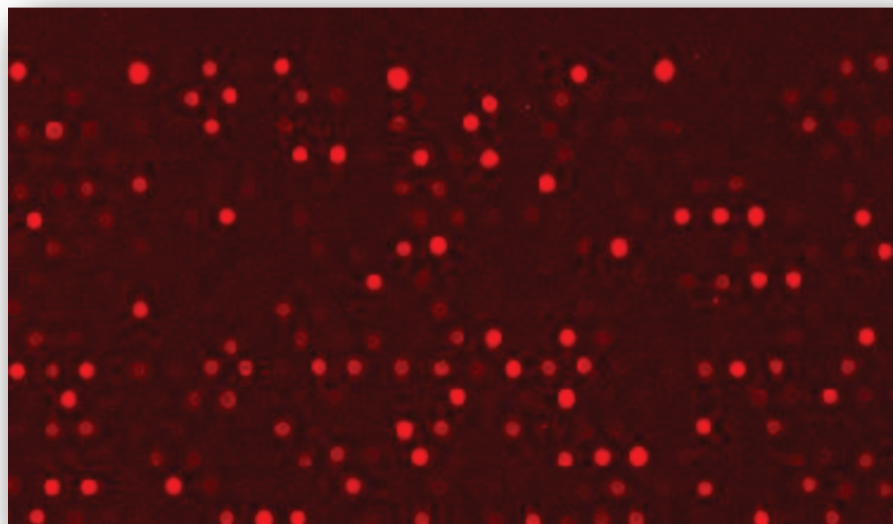


Figura 20. Imagem parcial resultante dos *bioarrays* após escaneamento.

4.9. Análise da expressão gênica pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR)

O método de PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR) é utilizado para a avaliação da expressão gênica. A expressão é dita relativa porque leva em consideração também a expressão de controles endógenos como, beta-actina e GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). A técnica consiste no monitoramento óptico da fluorescência emitida durante a reação da PCR (Higuchi *et al.*, 1993), pela da ligação de uma sonda específica ou um corante, na fita recém-sintetizada.

4.9.1. Seleção dos genes de interesse para confirmação pela técnica de RT-PCR.

Baseado nos resultados da triagem obtida com os *bioarrays* e em genes previamente descritos como correlacionados ao maior risco para o desenvolvimento de inibidores (Hwang *et al.* 2008), foram selecionados os genes para avaliação quanto à intensidade de expressão. Para isso foi utilizada a técnica de RT-PCR.

4.9.1.1. Desenho dos primers para a reação.

Os primers utilizados nas reações de RT-PCR foram desenhados com o uso do site www.idt.com e com o software Primer Express (Applied Biosystems) e estão listados na Tabela 7. Suas seqüências foram baseadas na seqüência dos genes selecionados por meio da plataforma CodeLink. Além desses foram incluídos outros três genes que apresentaram expressão diferenciada no trabalho desenvolvido por Hwang e col. (2008): IL-8; C4BPA e CXCL9. Esses genes inicialmente não demonstraram uma expressão diferenciada em nossos resultados obtidos com a plataforma “CodeLink”.

Os fragmentos desenhados foram submetidos ao programa Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para confirmar homologia com o gene de interesse. A formação de estruturas como hairpins e dimers também foram avaliadas com o programa Gene Runner (versão 3.5 Hastings Software, Inc.).

Tabela 7. Seqüência do *primers* e tamanho dos fragmentos amplificados para cada gene analisado por RT-PCR

Gene	Seqüência do <i>primer</i> 5'-3'	Tamanho do fragmento
LYPLA3	LYPLA3-345F -TGACTGCTGGATTGACAATATCA LYPLA3-429R-GACACGTACATCCACACCATCA	85 pb
CAMK1	CAMK1-553F- GCTGGATGCTGTGAAATACC CAMK1-669R- CCAAAGTCGGAGATCATGA	116 pb
PDE4A	PDE4A -1149F-CTTCCAGAACCTCAGCAA PDE4A -1287R-GCTGGTCACTTTCTTGGT	142 pb
CST7	CST7-622F- CACACCTTGAAGCAGACT CST7-756R- CTGGTGTTTGTTCATGGCT	137 pb
IL18RAP	IL18RAP-1785F-CCCTGAGCCTATTTCTGAT IL18RAP-1880R-CTTCTGCATACACTCCTCCT	96 pb
PTGS1	PTGS1-1454F-TCCAGGAGCTCGTAGGA PTGS1-1533R-GTAGAACTCCAACGCATCA	83 pb
IL10	IL10-375F- AAGGCGCATGTGAACTCCCT IL10-478R-TCCACGGCCTTGCTCTTGTTT	104 pb
C4BPA*	C4bpa-822F- TTGGGCCATGCCTCCATTTCTT C4bpa-923R-ATCTGGCTTGCGACAGGTGATT	102 pb
CXCL9*	Cxcl9 -68F- TGGGCATCATCTTGCTGGTTCT Cxcl9 -153R-TTGTTTGGTGTGCTGATGCAGGAA	86 pb
IL8*	IL8-277F-CACACTGCGCCAACACAGAAAT IL8-367R-ACAACCCTCTGCACCCAGTTT	91 pb
GAPDH	GAPDH_RT-173F- GCACCGTCAAGGCTGAGAAC GAPDH_RT-CCACTTGATTTTGGAGGGATCT	89 pb
Beta Actina	Beta Actina_RT-335F AGGCCAACCGCGAGAAG Beta Actina_RT-413R ACAGCCTGGATAGCAACGTACA	79 pb

*Genes que apresentam expressão diferenciada segundo Hwang e col., 2008.

4.9.1.2. Concentração dos *primers*

A concentração ideal de *primer* a ser utilizada em RT-PCR, deve ser a mínima suficiente para permitir a duplicação de todas as cópias do material a cada ciclo de reação. Desta forma, utilizando a mesma quantidade de amostra, foram feitas reações contendo cada um dos *primers* (sense e anti-sense) nas concentrações finais de 150 nM, 300 nM e 600 nM. A concentração ideal foi aquela em que o gene de interesse obteve o menor valor de Ct (ciclo de

threshold), ou seja, foi a concentração em que o gene foi amplificado mais precocemente. Na Tabela 8 estão listadas as concentrações dos *primers* utilizados na amplificação dos genes de estudo.

Tabela 8. Concentração ideal de cada par de *primer* obtida com a padronização do RT-PCR.

Genes	Concentração utilizada
LYPLA3	600 nM
CAMK1	150 nM
PDE4A	150 nM
CST7	150 nM
IL18RAP	150 nM
PTGS1	150 nM
IL-10	150 nM
C4BPA*	150 nM
CXCL9*	150 nM
IL-8*	150 nM
GAPDH	150 nM
Beta Actina	150 nM

*Genes que apresentam expressão diferenciada segundo o trabalho de Hwang *e col.*, 2008.

4.9.2. Padronização da reação de RT-PCR

As amostras de cDNAs utilizadas na reação de RT-PCR foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (NanoDrop Technologies, USA). As reações foram feitas em duplicatas utilizando como sistema de detecção o reagente SYBR™ Green PCR Master Mix® (Applied Biosystems, USA). Esse sistema além de conter todos os reagentes necessários

para PCR (dNTPs, MgCl₂, tampão, Taq Ampli-Gold), contém o corante SYBR Green, uma molécula que emite maior quantidade de sinal fluorescente ao intercalar com DNA dupla fita. Para cada gene analisado foram utilizados *primers* específicos (Tabela 7).

A detecção da amplificação em tempo real foi realizada no equipamento ABI 5700 Sequence Detector System (Applied Biosystems, USA) em gráficos de fluorescência versus número de ciclos. Quanto maior a expressão de um determinado gene, isto é, quanto mais cópias existirem dele no início da reação, mais precocemente ocorrerá a amplificação e conseqüentemente, menor será o Ct (Figura 21).

CXCL9



LYPLA3



Figura 21. Exemplificação da análise da curva de amplificação (fluorescência versus número de ciclos) após a reação de RT-PCR. Exemplo utilizando os primers correspondentes aos genes CXCL9 e LYPLA3.

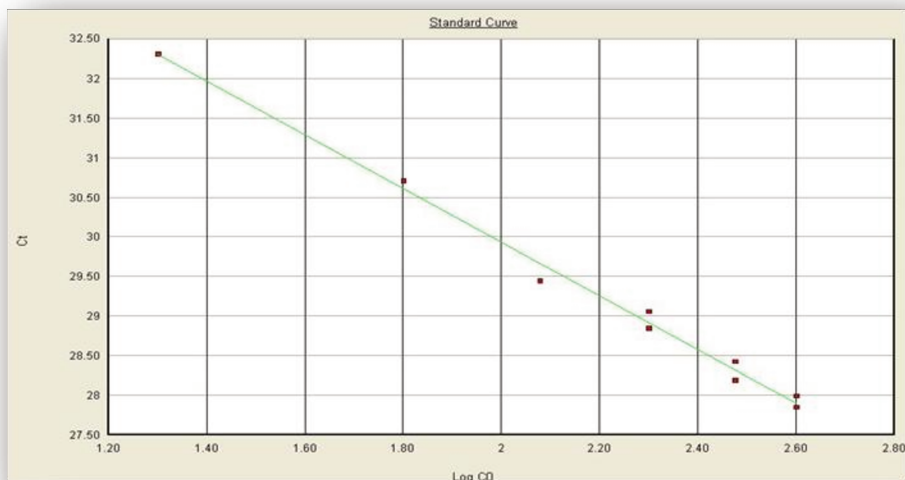
Todas as amostras foram preparadas em 25 μ l de volume final; sendo 12,5 μ l do reagente SYBR Green PCR Master Mix®, 250 ng de cDNA de cada gene e

a concentração ótima de *primer* determinada (Tabela 8). Em todas as placas foram pipetados controles negativos (NTC), ou seja, para cada *primer* avaliado foram feitos poços contendo água estéril em substituição à amostra. As reações foram realizadas em placas de 96 poços (Sorenson, BioScience Inc) com tampas plásticas que permitem a passagem da luz. O programa foi iniciado a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos: 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Ao final de uma amplificação normal adiciona-se um passo de 20 minutos, no qual a temperatura aumenta gradualmente de 60° para 95°C. À medida que os produtos gerados por PCR desnaturam com o aumento de temperatura, cai o sinal fluorescente do SYBR Green. O gráfico resultante permite verificar se há um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação, devido a diferenças de T_m (temperatura de fusão ou *melting temperature*) entre os produtos de PCR causadas pelo número e composição de bases de cada produto.

4.9.2.1. Cálculo da análise de eficiência da reação de RT-PCR

A reação de RT-PCR precisa ser confiável e reprodutiva. Para isso são necessárias condições ótimas de reação, onde as amplificações apresentem 100% de eficiência a cada ciclo da reação de PCR. A eficiência de amplificação é obtida pela fórmula $10^{(-1/slope)}$, onde *slope* é derivado da inclinação da curva, e esse valor quando aplicado a fórmula de eficiência, tem que ser próximo a 2, que significa que a cada ciclo de amplificação o material genômico está sendo duplicado e isso equivale a 100% de eficiência (Meijerink *et al.*, 2001). Na Figura 22 estão representadas como exemplo as curvas de eficiência dos *primers* LYPLA3 e CXLC9 utilizados neste estudo.

LYPLA3



CXCL9

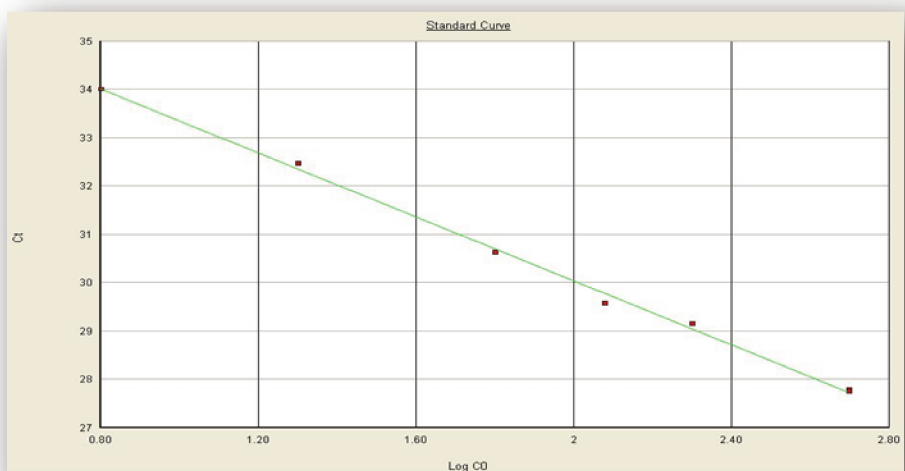


Figura 22. Exemplificação da análise da eficiência da amplificação do RT-PCR. Exemplo utilizando os *primers* para os genes CXCL9 e LYPLA3.

4.9.3. Análise dos resultados do RT-PCR

A expressão dos genes de interesse foi determinada de forma relativa, ou seja, os valores de expressão são normalizados em relação a genes chamados de “controles endógenos”. Neste trabalho foi utilizado o gene da beta actina (β -actina) e GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), que são genes cuja expressão é dita constitutiva, ou seja, apresentam pouca variação entre diversas condições.

Os valores de Ct (ciclo de *threshold*) de cada gene foram obtidos em duplicata, dessa forma foram calculadas as médias aritméticas para cada amostra por gene estudado. Em seguida foi obtido o valor de delta Ct (Δ Ct), que consistiu na subtração do menor Ct de um gene de uma determinada amostra com os demais Cts desse mesmo gene de outras amostras estudadas. O “Q” valor corresponde a $2^{\Delta\text{Ct}}$. Os valores de Q dos genes β -actina e GAPDH de cada amostra analisada foram submetidos ao programa geNorm (Vandesompele, *et al.*, 2002), que calculou a média geométrica entre eles, denominado de Fator de Normalização da amostra. A expressão normalizada de um dado gene de interesse em uma determinada amostra foi dada pela razão entre o valor de Q do gene de interesse da amostra pelo fator de normalização da amostra. O valor obtido foi expresso em unidades arbitrárias (UA) ou valor absoluto de expressão.

4.10. Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney, com uma significância estabelecida de $p < 0,05$. Todos os cálculos foram realizados utilizando-se o programa GraphPad InStat (versão 3.05 GraphPad Software, Inc.).

5. Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Dados demográficos dos casos incluídos

Foram incluídos 411 pacientes com hemofilia provenientes das cinco regiões territoriais do Brasil (Figura 23), sendo 23 casos do Hemocentro do Acre (Hemoacre), região Norte; 20 do Hemocentro da Bahia (Hemoba), região Nordeste; 40 do Hemocentro do Mato Grosso (Hemomat), região Centro Oeste; 70 do Hemocentro do Paraná (Hemepar), região Sul e 258 do Hemocentro da UNICAMP, Campinas, SP, região Sudeste (Tabela 9).

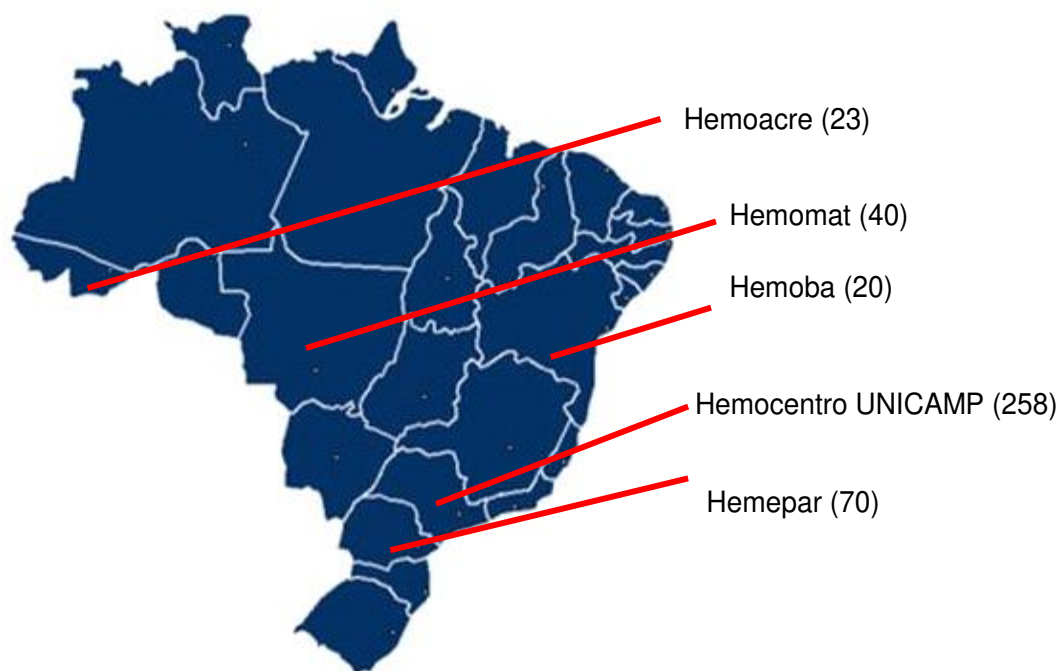


Figura 23. Distribuição dos casos de hemofilia incluídos no estudo, de acordo com centro e região territorial de origem. O valor entre os () representa o total de pacientes de cada região.

Dentre os 411 pacientes incluídos no estudo 321 (238 famílias) foram confirmados com diagnóstico de hemofilia A e 90 (59 famílias) como hemofílicos B. Os pacientes foram analisados em relação à presença de inibidores contra FVIII ou FIX. A presença de inibidores (acima de 0,6 UB/mL em no mínimo uma ocasião), foi detectada em 46 dos 220 hemofílicos A graves (21,2 %) sendo que 36 foram diagnosticados com inibidores de alta resposta. Não foram identificados inibidores entre os pacientes hemofílicos A moderados e leves assim como entre os pacientes hemofílicos B.

Tabela 9. Distribuição dos casos incluídos de acordo com diagnóstico e procedência.

Região	Hemofilia A			Hemofilia B		
	N = 321			N = 90		
	Grave	Moderada	Leve	Grave	Moderada	Leve
Norte						
Hemocentro do Acre (Hemoacre)	13	----	5	4	----	1
Nordeste						
Hemocentro da Bahia (Hemoba)	9	2	6	----	----	3
Centro-Oeste						
Hemocentro do Mato Grosso (Hemomat)	22	6	5	3	----	4
Sul						
Hemocentro do Paraná (Hemepar)	43	9	3	2	8	----
Sudeste						
Hemocentro da Unicamp (Campinas-SP)	133	26	36	26	25	10
Total	220	43	55	35	33	18

Levando-se em conta o antecedente étnico, do total de 411 pacientes incluídos, 50,85 % (209 / 411) foram classificados como caucasóides, 36,25 %

(149 / 411), como negros e 9,49 % (39 / 411) como índios brasileiros. Entre apenas os hemofílicos A, 51,40 % (165 / 321) eram caucasóides, 36,14 % (116 / 321) eram negros e 9,66 % (31 / 321) eram descendentes dos índios brasileiros. No entanto, essa proporção foi diferente quando considerado os 46 pacientes hemofílicos A com inibidor (acima de 0,6 UB/mL em no mínimo uma ocasião), onde 56,52 % (26 / 46) foram classificados como negros, 39,13 % (18 / 46) como caucasóides e 4,35% (2 / 46) como índios brasileiros, de acordo com os critérios étnicos adotados. Entre os 36 casos de inibidores de alta resposta, 20 (55,5 %) eram negros.

5.2. Caracterização dos inibidores de acordo com a reatividade e classe subclasse das imunoglobulinas.

Amostras de plasma de 30 entre os 46 pacientes positivos para a presença de inibidores, foram analisadas para a determinação da classe e subclasse de imunoglobulina (Ig) IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM a que pertence o inibidor. Essa caracterização foi realizada pelo método de ELISA, tendo sido investigada a reatividade em três diferentes produtos comerciais de concentrado de fator VIII, comumente utilizados em nosso país para o tratamento da hemofilia A, incluindo: a) concentrado de FVIII Octavi SD Optimun® (Octapharma-França); b) concentrado de FVIII 8Y® (Bio Products Laboratory-Reino Unido); c) concentrado de FVIII Hemofil® (Baxter Healthcare Corporation-USA).

Devido a falta de um padrão de normalidade que pudesse ser adotado para a determinação dos valores e concentrações de Ig encontradas (curva de calibração), foi adotado como critério a análise da positividade de acordo com as diluições encontradas, sendo a amostra negativa quando a intensidade da reatividade foi igual ou inferior ao controle negativo (BSA 4%) e positivo quando superiores ao controle negativo. A intensidade de positividade variou de + a ++++ conforme as diluições utilizadas, sendo: + 1:10; ++ 1:40; +++ 1:80 e ++++ 1:320 (Lindegren et al., 2002).

Entre os 30 casos analisados, foi possível determinar a subclasse de Ig em 27 casos (Tabela 10). A maioria dos casos apresentou positividade para as subclasses IgG1 e IgG4 simultaneamente (7 / 27). Outros 5 casos foram positivos apenas para a classe IgG1 e 3 apenas para IgG4. Conforme já demonstrado na literatura, embora 9 casos tenham apresentado alguma positividade para a classe IgG2, isso ocorreu em associação à IgG1 e/ou IgG4 (Lindegren et al., 2002). Apenas 3 casos foram positivos para IgG3 e novamente exclusivamente em associação à IgG1 e/ou IgG4. Isto sugere que dois subconjuntos de células T helper estão envolvidas, Th1 que secretam citocinas pró-inflamatórias, como o interferon-gama, fator de necrose tumoral e interleucina-2 que ajudam na síntese de anticorpos fixadores do complemento, tais como as IgG1 e células Th2 que secretam citocinas anti-inflamatórias com interleucina-4 e interleucina-10 que podem estimular as células B a produzirem anticorpos tais como da subclasse IgG4. Em nenhum dos casos houve reatividade à IgM.

Sobre a análise dos diferentes produtos, houve uma considerável redução da reatividade ao concentrado de FVIII 8Y® (Bio Products Laboratory-Reino Unido). Esse produto é classificado como de pureza intermediária, ou seja, apresenta considerável concentração de FVW em sua composição. De fato, é discutido que a presença de FVW possa reduzir a atividade dos inibidores (KALLAS, A. & TALPSEP, T. 2001), estando provavelmente relacionado ao fato de “ocultar” possíveis epítomos ou alterar a conformação do FVIII quando há ligação entre FVIII e FVW.

Tabela 10. Caracterização dos inibidores de acordo com as subclasses de imunoglobulinas.

Identificação	*UB/ml	IgG1			IgG2			IgG3			IgG4			IgM		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1	2,8	++	-		-	-		-	-		-	-		-	-	
2	115	++	-	+++	++	-	-	-	-	-	++++	-	++++	-	-	-
3	14,5	-	-		-	-		-	-		+	-		-	-	
4	8	+++	-		-	-		-	-		+	-		-	-	
5	1,9	++++	-		-	-		+	-		+	-		-	-	
6	0,7	++++	-		+	-		-	-		-	-		-	-	
7	0,75	++	-		+	-		-	-		-	-		-	-	
8	0,95	+++	-		-	-		-	-		-	-		-	-	
9	35	-	-		-	-		++++	-		++++	-		-	-	
10	384	+	+	++++	-	-	-	-	-	-	+	-	++++	-	-	-
11	0,9	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	8,4	+++	-	++	+++	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
13	5	++	-		-	-		-	-		-	-		-	-	
14	58	-	-		-	-		-	-		++++	-		-	-	
15	11,5	++++	-		++++	-		-	-		++	-		-	-	
16	11	++++	-		-	-		-	-		++++	-		-	-	
17	1,4	+	-		-	-		-	-		+	-		-	-	
18	2	++++	-		-	-		-	-		-	-		-	-	
19	0,6	-	-		-	-		-	-		++++	-		-	-	
20	7,4	++++	-		-	-		-	-		++++	-		-	-	
21	25	++	-		-	-		-	-		+++	-		-	-	
22	16	++	-		+++	-		-	-		+	-		-	-	
23	155	+	-		+	-		-	-		+++	-		-	-	
24	12,5	+	-		-	-		-	-		+	-		-	-	
25	12	+	-	+	+	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-
26	5,6	++	-	++	++	-	-	-	-		+	-	+	-	-	-
27	40	++++	-		++++	-		++	-		++++	-		-	-	

Intensidade da reatividade de acordo com diluições: + 1:10; ++ 1:40; +++ 1:80 e ++++ 1:320.

I. concentrado de fator VIII Octavi SD Optimun® (Octapharma-França); II. concentrado de fator VIII 8Y® (Bio Products Laboratory-Reino Unido); III. concentrado de fator VIII Hemofil® (Baxter Healthcare Corporation-USA). *UB/mL no momento da análise.

5.3. Identificação das alterações moleculares no gene do FVIII.

A análise da presença da inversão do íntron 22 e da inversão do íntron 1 foi positiva respectivamente em 99 (45 %) e 5 (2,27 %) dos 220 pacientes hemofílicos A graves. Entre os 116 pacientes com HA grave, negativos para as INV-1 e INV-22, a mutação no gene do FVIII, relacionada à presença de hemofilia A foi determinada em 38 casos, pertencentes a 26 famílias. Entre as mutações identificadas entre as famílias pacientes com HA grave, 10 mutações eram do tipo *stop codon*, 12 do tipo *missense* e 4 do tipo *frameshift*. Oito mutações (2 *missense*, 4 *stop* e 2 *frameshift*) ainda não foram descritas na literatura ou no banco de dados de mutações para hemofilia A (<http://europium.csc.mrc.ac.uk>). Entre as famílias pertencentes aos grupos de pacientes hemofílicos A moderados e leves foram determinadas respectivamente 7 e 9 mutações, todas do tipo *missense*. Esses dados estão demonstrados na Tabela 11.

As mutações do gene do FVIII podem ser divididas entre alto risco e baixo risco para o desenvolvimento de inibidores (Oldenburg *et al.*, 2002). Entre os casos de hemofilia A grave incluídos nesse estudo, 144 de 99 famílias tiveram a mutação identificada. Desses casos 33 (22,9 %) desenvolveram inibidor. Entre os pacientes com inibidor, dos casos que tiveram a mutação identificada, 100% apresentaram mutações consideradas de alto risco para o desenvolvimento de inibidor. Quando analisamos o total de casos com mutações definidas como de alto risco para inibidor, 33/125 (26.4 %) apresentaram inibidor.

Tabela 11. Mutações do gene do FVIII identificada em pacientes hemofílicos A.

Família	Tipo de HA	Mutação	Éxon do gene FVIII
002	MODERADA	p.H94R	3
004	MODERADA	p.R1941Q	18
005	GRAVE	p.N618D	13
010	LEVE	p.L1789F	16
012	MODERADA	p.H1848P	17
013	GRAVE	c.2800_2802del	14
022	LEVE	p.M2238V	25
023	GRAVE	p.I2262T	25
027	GRAVE	p.R1997T	19
028	GRAVE	p.R2147Stop	23
034	GRAVE	p.R1941Stop	18
036	LEVE	p.R2150H	23
039	LEVE	p.R2159C	23
047	GRAVE	p.R336Stop	8
049	GRAVE	p.D56V*	2
051	GRAVE	p.L1021Stop*	14
053	GRAVE	p.R1997W	19
054	MODERADA	p.R336STOP	8
055	GRAVE	p.R1997W	19
057	GRAVE	p.G1751V*	15
060	GRAVE	p.R336Stop	8
075	LEVE	p.v266G	7
082	MODERADA	p.v266G	7
083	GRAVE	p.M2238V	25
113	GRAVE	c.4379_4380insA	14
116	MODERADA	p.R372H	8
123	GRAVE	p.H94R	3
141	GRAVE	c.4866_4868del*	14
144	GRAVE	p.G1659Stop*	14
152	GRAVE	p.R1997T	19
160	GRAVE	p.W2229Stop*	20
163	GRAVE	p.R2307Stop	26
182	GRAVE	p.R2116Stop	22
192	GRAVE	p.w68Stop*	2
203	GRAVE	p.R1997T	19
205	GRAVE	c.3637_3639insA	14
207	GRAVE	p.R1997T	19
221	GRAVE	156, 25_26 insA*	4

* Mutação não descrita no banco de dados (<http://europium.csc.mrc.ac.uk>)

5.4. Identificação das alterações moleculares no gene do FIX.

Dos 90 pacientes (59 famílias), a mutação no gene do FIX foi determinada em 49 das 59 famílias de pacientes com hemofilia B (Tabela 12). Entre as mutações identificadas, 37 famílias apresentaram mutação do tipo *missense*; seis do tipo *stop codon*, três *sitio de splicing*, duas *frameshift* e uma na região promotora. Seis famílias apresentaram mutações (5 *missense* e 1 deleção) ainda não descritas no banco de dados de mutações para hemofilia B (www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html/). Como era esperado cerca de 54 % das mutações foram localizadas no éxon 8 do gene do FIX, provavelmente por ser o maior éxon do gene do FIX, correspondendo a 23 % do RNAm.

Tabela 12. Mutações identificada em pacientes hemofílicos B

FAMÍLIA	GRAU	MUTAÇÃO	Éxon	FAMÍLIA	GRAU	MUTAÇÃO	Éxon
001	GRAVE	p. R29Stop	2	031	GRAVE	p.R252Stop	8
002	GRAVE	donor splice +7		033	GRAVE	p.C361R	8
003	MODERADA	p.T296M	8	035	MODERADA	p.G190D	6
004	MODERADA	pR248Q	8	036	MODERADA	p.E224Stop	7
005	MODERADA	pR248Q	8	037	GRAVE	c.31107_3109del	8
006	MODERADA	p.A233T	7	038	MODERADA	p.D359H*	8
007	GRAVE	p.W215G	7	040	MODERADA	p.G190D	6
008	MODERADA	p.M348V	8	042	MODERADA	p.R333Q	8
009	GRAVE	p.P367T	8	043	MODERADA	Donor splice + 4	
010	GRAVE	p.H221N	7	044	MODERADA	p.M348V	8
011	LEVE	p.R29Q	2	047	MODERADA	p.R248Stop	8
012	LEVE	PROMOTOR		061	MODERADA	p.A390T*	8
013	GRAVE	p.W215C*	7	064	MODERADA	p.R248Q	8
014	MODERADA	p.M348V	8	066	LEVE	p.I382N	8
015	GRAVE	p.C132R	6	076	GRAVE	p.R180Q	6
017	GRAVE	p.A248Stop	8	083	GRAVE	p.C95Y	5
018	GRAVE	p.P116R	5	084	MODERADA	p.A233T	7
019	GRAVE	p.L326R	8	091	MODERADA	pR248Q	8
021	MODERADA	R248stop	8	092	LEVE	pR248Q	8
022	GRAVE	p.C18R	2	094	LEVE	p.F321P	8
023	MODERADA	p.P368T	8	096	GRAVE	c.31291_31297del*	8
023	MODERADA	p.P368T	8	097	GRAVE	p.W385C	8
026	GRAVE	p.R180W*	6	098	LEVE	p.K400N	8
028	MODERADA	DONOR SPLICE	1	099	LEVE	p.R248Q	8
030	GRAVE	p.V231F*	7				

*Mutações não descritas no banco de dados (www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html).

5.5. Frequência dos haplótipos do gene do FVIII em pacientes hemofílicos A graves e correlação com o risco de inibidor.

Recentemente Viel *et al.* (2009) descreveram que a presença de seis haplótipos distintos (H1 a H6), determinados pela presença de quatro SNPs (R484H, R776G, M2238V e D1241E) no gene do FVIII, contribuem farmacogeneticamente para um risco elevado no desenvolvimento de inibidor em negros norte-americanos (Viel *et al.*, 2009).

Nesse estudo, a análise de 148 HA graves para a presença dos seis haplótipos demonstrou que o haplótipo H1 estava presente em 104 (70 %), H2 em 35 (24 %) e H3 em 9 (6 %). Não foram observadas as alterações R484H e R776G nestes pacientes, desta forma não ocorreu expressão dos H4, H5 e H6. Todos os três haplótipos foram expressos em negros com HA grave, com prevalência do haplótipo H1 em 62 %, do H2 em 26 % e do H3 em 12 %. Em caucasóides com HA grave, apenas o haplótipo H1 e H2, sendo a prevalência de 74 % e 26 %, respectivamente. Os casos com HA grave classificados como pertencentes ao grupo de índios brasileiros apenas o haplótipo H1 foi identificado.

A **Tabela 13** resume os resultados dos haplótipos do FVIII, e a prevalência do inibidor em cada grupo étnico. Dos 148 HA graves analisados, 38 (25,6 %) apresentaram inibidores > 0,6 UB/mL detectado em pelo menos um momento. A prevalência do inibidor foi maior entre os negros com HA grave (24 / 77, 31%). Entre os pacientes caucasóides, 22% apresentaram inibidor detectado (13 / 57). Apenas 7% dos HA grave com antecedente indígena incluídos nessa análise apresentaram inibidor detectado (1 / 14).

Apesar da presença de inibidor ser maior no grupo de pacientes HA grave negros, essa ocorrência não pode ser explicada pela presença dos haplótipos do FVIII. Não foi observado diferença estatística em relação à presença de inibidores e presença de haplótipos diferentes do fator VIII quando analisados em sua totalidade ou estratificados por grupos étnicos.

Tabela 13. Frequência dos haplótipos do gene do FVIII e prevalência de inibidores em pacientes com hemofilia A grave.

Inibidor	Total		Haplótipo do Fator VIII								P
	Sim n.(%)	Não n.(%)	H1		H2		H1+H2		H3		Valor
	Sim n.(%)	Não n.(%)	Sim n.(%)	Não n.(%)	Sim n.(%)	Não n.(%)	Sim n.(%)	Não n.(%)	Sim n.(%)	Não n.(%)	
Total geral	38(25)	110(75)	25(17)	79(53)	12(8)	23(15)	37(25)	102(69)	1(1)	8(5)	
Negros (n= 77 de 51 famílias)											
Média de idade, anos [faixa]	22[4-61]	19[2-45]	25[4-61]	20[2-45]	19[5-37]	21[6-43]	23[4-61]	22[2-45]	13[13]	13[6-21]	
Tipo de mutação do FVIII											
Alto risco para inibidor	14(18)	37(48)	10(13)	23(30)	3(4)	8(10)	13(17)	31(40)	1(1)	6(8)	0.66
Baixo risco para inibidor	0	1(1)	0	1(1)	0	0	0	1(1)	0	0	
Genotipagem não finalizada	10(13)	15(20)	6(8)	8(10)	4(5)	5(7)	10(13)	13(17)	0	2(3)	0.50
Total	24(31)	53(69)	16(21)	32(41)	7(9)	13(17)	23(30)	45(58)	1(1)	8(11)	
Caucasóides (n= 57 de 43 famílias)											
Média de idade, anos [faixa]	23[5-71]	25[3-69]	26[5-71]	25[3-69]	18[9-36]	25[7-25]	23[5-71]	25[3-69]	0	0	
Tipo de mutação do FVIII											
Alto risco para inibidor	10(17)	22(39)	5(9)	17(30)	5(9)	5(9)	10(17)	22(39)	0	0	
Baixo risco para inibidor	0	6(11)	0	3(5)	0	3(5)	0	6(11)	0	0	
Genotipagem não finalizada	3(5)	16(28)	3(5)	14(25)	0	2(3)	3(5)	16(28)	0	0	
Total	13(22)	44(78)	8(14)	34(60)	5(9)	10(17)	13(22)	44(78)	0	0	
Índios brasileiros (n= 14 de 8 famílias)											
Média de idade, anos [faixa]	40[40]	25[10-45]	40[40]	25[10-45]	0	0	40[40]	25[10-45]	0	0	
Tipo de mutação do FVIII											
Alto risco para inibidor	1(7)	12(86)	1(7)	12(86)	0	0	1(7)	12(86)	0	0	
Baixo risco para inibidor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Genotipagem não finalizada	1(7)	0	1(7)	0	0	0	0	1(7)	0	0	
Total	1(7)	13(93)	1(7)	13(93)	0	0	1(7)	13(93)	0	0	

5.6. Análise de expressão gênica de células mononucleares circulantes em pacientes com e sem inibidores.

A triagem de possíveis genes relacionados ao desenvolvimento de inibidores foi realizada pela análise da expressão gênica em células mononucleares circulantes com o uso de *bioarrays* e posteriormente pela técnica de RT-PCR. Para a realização dessa análise foram selecionados pacientes de uma mesma família que fossem discordantes para a presença de inibidores, além de um grupo não relacionado de pacientes com e sem inibidores. Todos os pacientes selecionados com presença de inibidor foram classificados como altos respondedores para inibidor.

5.6.1. Seleção dos pares de pacientes de uma mesma família discordantes para a presença de inibidores.

A casuística compreendeu cinco pares de membros de uma mesma família, ambos com diagnóstico de hemofilia A grave, discordantes para a presença de inibidores. Um dos pares não foi considerado para a análise final, pois embora na inclusão dos casos um dos irmãos era negativo para a presença de inibidor, no momento da coleta do RNA ambos apresentaram inibidor em altos títulos.

Dos quatro pares analisados, um par é acompanhado no Ambulatório de Hemostasia do Hemocentro – Unicamp, Campinas; dois pares no Hemepar (Hemocentro do Paraná, Curitiba, PR) e um par no Hemoba (Hemocentro da Bahia, Salvador, BA). Os dados demográficos e laboratoriais estão descritos na Tabela 14.

Tabela 14. Características dos pacientes selecionados para realização da técnica de *microarrays*.

	PAR 1		PAR 2		PAR 3		PAR 4	
Inibidor	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não
Idade (anos)	10	24	32	31	32	69	13	21
Inibidor na coleta (UB/mL)	27	0	7.4	0	NR	0	NR	0
Inibidor pico histórico (UB/mL)	60	0	28	0	150	0	448	0
Grupo étnico	C	C	C	C	C	C	N	N
Mutação	INV-22	INV-22	ND	ND	INV-22	INV-22	INV-22	INV-22
HCV	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Trat.	Trat.	Neg.	Neg.
HIV	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.

ND: mutação ainda não determinada; INV-22: inversão do íntron 22; C: Caucásóides; N: negro, Neg.;Negativo; Pos.: Positivo; Trat: Em tratamento

5.6.1.1. Descrição dos pares de uma mesma família selecionados.

Par nº 1 (Hemocentro – Unicamp, Campinas, SP)

Paciente 1. I.B.A. (Figura 24; III-3), masculino, caucasóide, 10 anos de idade, natural e procedente de São José dos Campos, SP. Foi diagnosticado com hemofilia A grave no primeiro ano de vida, tendo recebido concentrado de FVIII pela primeira vez aos 6 meses de idade. Em 2001 foi detectada a presença de inibidor contra FVIII, com maior título registrado (pico histórico) de 60 UB/mL A análise molecular do gene do FVIII identificou a INV-22 como causa do fenótipo de hemofilia A grave.

Paciente 2. W.C.C.C. (Figura 24; III-5), masculino, caucasóide, 17 anos, natural de São Paulo, procedente de São José dos Campos, SP. Apresenta como co-morbidade sorologia positiva para vírus da hepatite C (HCV) e grave artropatia em ambos joelhos. Desde seu diagnóstico, em nenhum momento foi detectado a

presença de inibidor. A análise molecular do gene do FVIII confirmou a presença da INV-22.

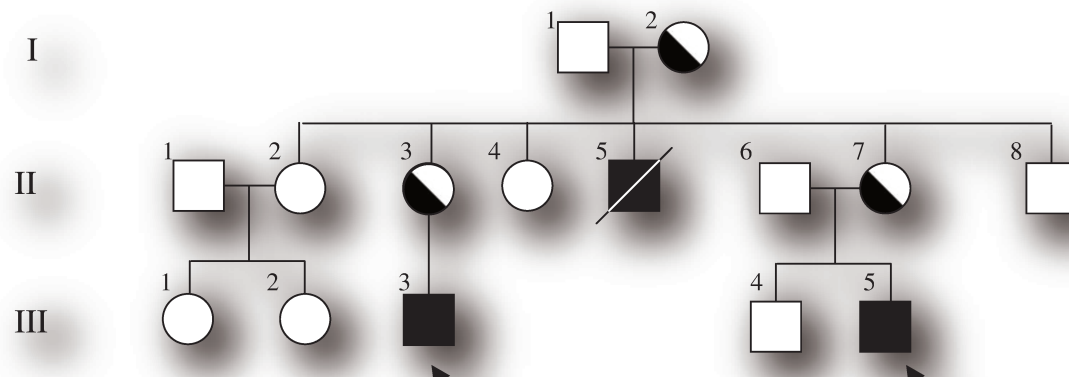


Figura 24. Par 1. Heredograma representando o histórico familiar para hemofilia (FA 037). Paciente-1(III-3) (→) e paciente-2 (III-5) (----->) foram diagnosticados como hemofílicos A grave, associada a presença da INV-22 no gene do FVIII. Paciente 1 (III-3) apresenta formação de inibidor (maior título 60 UB/mL). O indivíduo II-5 faleceu devido a complicações ocasionadas após contrair o HIV durante transfusão e não há informações sobre a presença de inibidores neste indivíduo.

Paciente 3. S.J.M. (Figura 25; III-5), masculino, caucasóide, 31 anos de idade, natural e procedente de União da Vitória, PR. Foi diagnosticado com hemofilia A grave aos 11 meses de idade, sendo tratado com crioprecipitado até 1997 quando iniciou o tratamento com concentrado de FVIII. A presença de inibidores foi constatada aos 7 anos de idade e o maior título registrado foi 29 UB/mL. A genotipagem para mutação do gene do FVIII ainda foi não finalizada.

Paciente 4. N.F.S. (Figura 25; III-2), masculino, caucasóide, 29 anos de idade, natural de União da Vitória, PR e procedente de Curitiba, PR. Foi diagnosticado com hemofilia A grave aos 6 meses de idade, sendo tratado com crioprecipitado até 1993 quando iniciou o tratamento com concentrado de FVIII. Não foi constatada a presença de inibidores. A genotipagem para mutação do gene do FVIII ainda foi não finalizada.

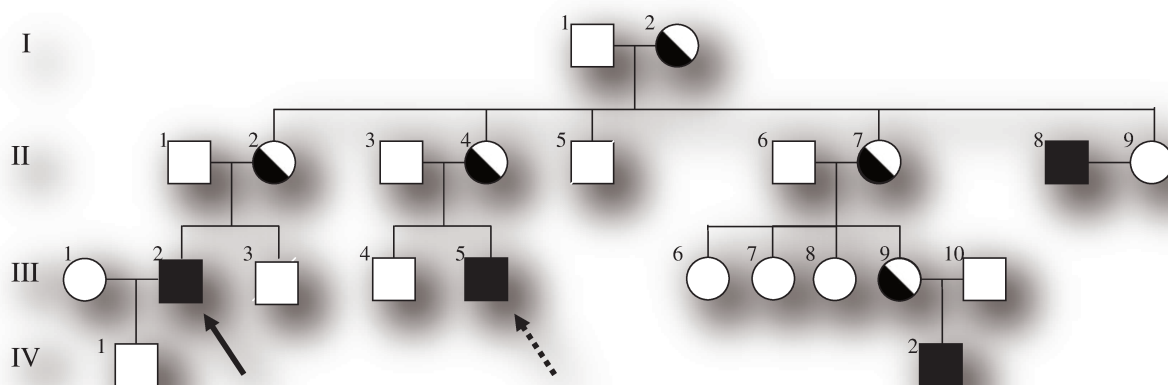


Figura 25. PAR 2. Heredograma representando o histórico familiar para hemofilia (FA 181). Paciente-3 (III-5) (--->) e paciente-4 (III-2) (→) foram diagnosticados como hemofílicos A grave. Paciente 3 (III-5) apresenta inibidor (maior título 29 UB/mL). Os indivíduos II-8 e IV-2 também possuem o diagnóstico de hemofilia A grave e não há informações sobre a presença de inibidores nestes indivíduos.

Par nº 3 (Hemepar - Hemocentro do Paraná, Curitiba, PR)

Paciente 5. G.B. (Figura 26; II-6) masculino, caucasóide, 67 anos de idade, natural e procedente de União da Vitória, PR. Não há registro da data do diagnóstico. Recebeu diversas transfusões de sangue entre 1958 a 1980 quando iniciou o tratamento com crioprecipitado. A partir de 1993 iniciou uso concomitante de concentrado FVIII, recebendo crioprecipitado pela última vez em 1999. Foi diagnosticado como soro positivo para o HIV (vírus da imunodeficiência humana), atualmente em tratamento. Em nenhum momento foi constatada a presença de inibidores. A análise molecular do gene do FVIII identificou a INV-22 como causa do fenótipo de hemofilia A grave.

Paciente 6. J.R.J. (Figura 26; III-6), masculino, caucasóide, 31 anos de idade, natural de União da Vitória, PR, procedente de Curitiba, PR. Foi diagnosticado como hemofílico A grave aos 10 meses de idade, sendo tratado com crioprecipitado até 1986 quando iniciou o tratamento com concentrado de FVIII. A presença de

inibidores foi constatada aos 21 anos de idade e o maior título registrado foi de 155 UB/mL (2001). A análise molecular do FVIII confirmou a presença da INV-22.

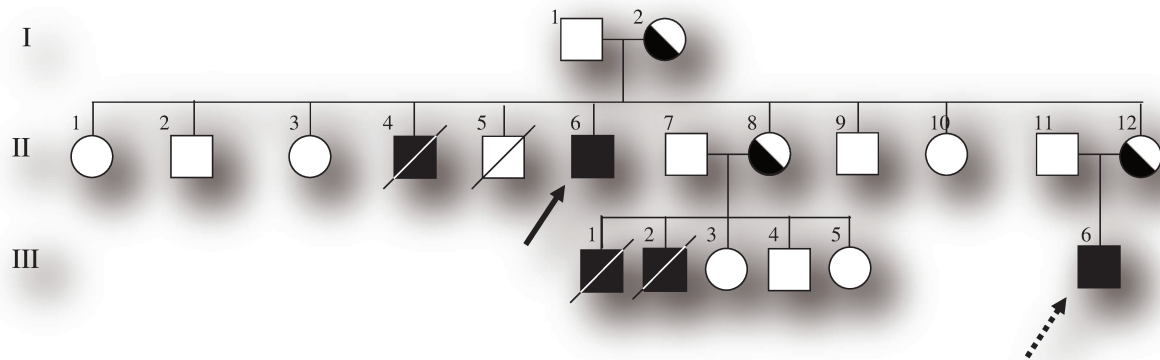


Figura 26. PAR 3. Heredograma representando o histórico familiar para hemofilia (FA 161) Paciente-5 (II-6) (→) e Paciente-6 (III-6) (---->) foram diagnosticados como hemofílicos A graves, associados a INV 22. Paciente 6 (III-6) apresenta formação de inibidor (maior título 155 UB/mL). Os indivíduos II-4, III-1 e III-2 faleceram durante a infância decorrente de episódios hemorrágicos e não há informações sobre a presença de inibidores nestes indivíduos.

Par nº 4 (Hemoba - Hemocentro da Bahia, Salvador, BA)

Paciente 7. G.H.T.F. (Figura 27; III-5) masculino, negro, 11 anos de idade, natural e procedente de Salvador, BA. Foi diagnosticado como hemofílico A grave no primeiro ano de vida. Iniciou o tratamento com concentrado de FVIII em 1997 não fazendo uso de crioprecipitado. A presença de inibidores foi constatada aos 5 anos de idade. Maior título de inibidor detectado foi de 448 UB/mL (2003). A análise molecular do gene do FVIII identificou a INV-22 como causa do fenótipo de hemofilia A grave.

Paciente 8. G.H.T.F. (Figura 27, III-4), masculino, pardo, 19 anos de idade, natural e procedente de Salvador, BA. Foi diagnosticado como hemofílico A grave em 1992 quando iniciou o tratamento com crioprecipitado. Em 1997 iniciou o uso de

concentrado de FVIII. Não foi constatada a presença de inibidores em nenhum momento. A análise molecular do FVIII confirmou INV-22.

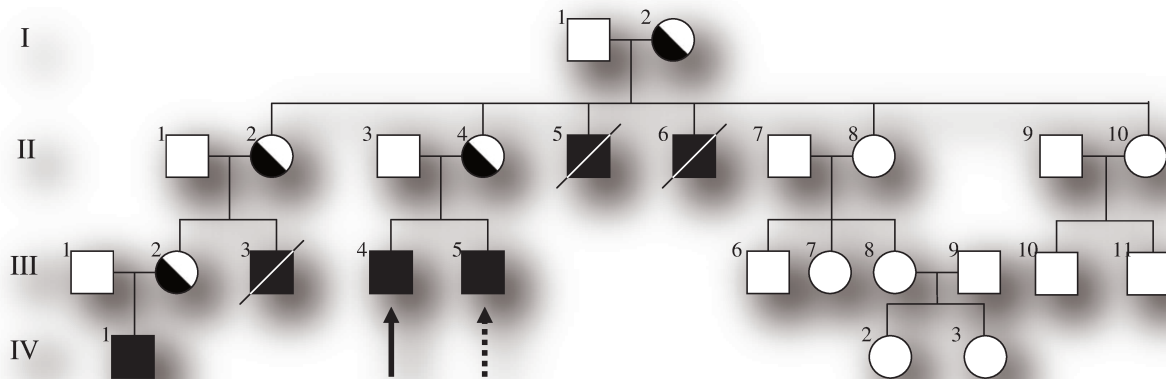


Figura 27. Par 4. Heredograma representando o histórico familiar para hemofilia (FA 243). Paciente-7 (III-5) (---->) e Paciente-8 (III-4) (→) foram diagnosticados como hemofílicos A grave, associado a INV-22. Paciente 7 (III-5) apresenta inibidor de altos títulos (pico histórico 448UB/mL). Os indivíduos II-5 e II-6 faleceram durante a infância decorrente de episódios hemorrágicos. O indivíduo IV-1 também possui diagnóstico de hemofilia A grave. Não há informações sobre a presença de inibidores nos indivíduos II-5, II-6 e IV-1

5.6.2. Seleção de grupos de pacientes não relacionados com presença ou ausência de inibidores.

Para a realização da análise da expressão gênica foram selecionados 12 pacientes com HA grave não relacionados sendo sete pacientes com presença de inibidores e cinco com ausência de inibidores. Os dados demográficos e laboratoriais desses pacientes estão descritos na

Tabela 15.

Tabela 15. Características dos pacientes não relacionados selecionados para realização da técnica de *microarrays (pool)* e *RT-PCR*

					Título inibidor (UB/mL)				
Identificação		Idade (anos)	Grupo étnico	Mutação no gene do FVIII	HIV	HCV	Pico histórico	Inibidor na coleta	
								microarray	RT-PCR
Grupo AR (pacientes alto respondedores para inibidores)									
AR-1	P.B.C.	4	C	INV-22	Neg.	Neg.	150	17	17
AR -2	V.F.S.S.	30	C	p.G1659Stop	Neg.	Pos.	160	8	8
AR -3	J.J.S.	36	C	p.R1941Stop	Neg.	Pos.	43	2,4	2,4
AR -4	E.S.K	28	N	ND	Neg.	Pos.	60	22,8	NU
AR -5	S.B.	33	N	c.4866_4868del	Neg.	Pos.	13,5	2,1	2,1
AR -6	I.B.A	10	N	INV-22	Neg.	Neg.	60	22	4,75
AR -7	S.M.J.	16	N	ND	Neg.	Neg.	10	NU	0
Grupo IA (pacientes sem presença de inibidores)									
IA-1	H.P.C.	38	N	ND	Pos.	Pos.	0	0	0
IA-2	R.D.N	35	C	INV-22	Pos.	Pos.	0	0	0
IA-3	N.T.S.	31	N	INV-22	Neg.	Neg.	0	0	0
IA-4	E.J.G.	33	C	INV-22	Pos.	Neg.	0	0	0
IA-5	J.C.	78	C	INV-22	Neg.	Neg.	0	NU	0

AR: Alto respondedor; IA: inibidor ausente; ND: mutação ainda não determinada; INV-22: inversão do íntron 22; C: Caucásios; N: negro, Neg.;Negativo; Pos.: Positivo; NU. Não utilizada

5.6.2.1. Descrição dos pacientes não relacionados selecionados

Grupo AR. Hemofílicos A grave alto respondedores para inibidores

Paciente AR-1: P.B.C. masculino, caucásio, 4 anos de idade, natural e procedente de Ubatuba, SP. Foi diagnosticado com HA grave aos 8 meses de idade, tendo recebido concentrado de FVIII pela primeira neste mesmo período. Em 2006,

foi detectada a presença de inibidor contra o FVIII, com maior título registrado (pico histórico) de 150 UB/mL. A análise molecular do gene do FVIII identificou a INV-22 como causa do fenótipo de HA grave.

Paciente AR-2: V.F.S.S. masculino, caucasóide, 30 anos de idade, natural e procedente de Caraguatatuba, SP. Foi diagnosticado com HA grave na infância. Teve o maior título registrado (pico histórico) de 160 UB/mL. A genotipagem para mutação do gene do FVIII identificou c.4866_4868del como causa do fenótipo de hemofilia A grave.

Paciente AR-3: J.J.S. masculino, negro, 36 anos de idade, natural e procedente de Araras, SP. Foi diagnosticado com HA grave na infância, teve o maior título registrado (pico histórico) de 43 UB/mL. A análise molecular do gene do FVIII identificou a p.G1659Stop como causa do fenótipo de HA grave.

Paciente AR-4: E.S.K masculino, pardo, 28 anos de idade, natural e procedente de Campinas, SP. Foi diagnosticado com HA grave na infância. Teve o maior título registrado (pico histórico) de 60 UB/mL. A genotipagem para mutação do gene do FVIII ainda foi não finalizada.

Paciente AR-5: S.B. masculino, negro, 33 anos de idade, natural de Jundiaí, SP e procedente de Campinas, SP. Teve o maior título registrado (pico histórico) de 13,5 UB/mL. A genotipagem para mutação do gene do FVIII identificou c.4866_4868del como causa do fenótipo de hemofilia A grave.

Paciente AR-6: I.B.A., masculino, caucasóide, 10 anos de idade, natural e procedente de São José dos Campos, SP. Foi diagnosticado com hemofilia A grave no primeiro ano de vida, tendo recebido concentrado de FVIII pela primeira vez aos 6 meses de idade. Em 2001 foi detectada a presença de inibidor contra FVIII, com

maior título registrado (pico histórico) de 60 UB/mL. A análise molecular do gene do FVIII identificou a INV-22 como causa do fenótipo de hemofilia A grave.

Paciente AR-7: S.M.J., masculino, negro, 16 anos de idade, natural e procedente de Guarapuava, PR. Foi diagnosticado com hemofilia A grave no primeiro ano de vida, tendo recebido concentrado de FVIII pela primeira vez aos 8 meses de idade. Em 1999 foi detectada a presença de inibidor contra FVIII, com maior título registrado (pico histórico) de 10 UB/mL. A genotipagem para mutação do gene do FVIII ainda foi não finalizada.

Grupo IA. Hemofílicos A grave sem inibidor

Paciente IA-1: H.P.C. masculino, negro, 38 anos de idade, natural Riacho de Santana, BA e procedente de Campinas, SP. Foi diagnosticado como soro positivo em 1988, e com o diagnóstico de hemofilia A grave na infância. Não foi constatada a presença de inibidores em nenhum momento. A genotipagem para mutação do gene do FVIII ainda foi não finalizada.

Paciente IA-2: R.D.N. masculino, caucasóide, 35 anos de idade, natural de Estiva Gerbi, SP e procedente de Campinas, SP. A análise molecular do gene do FVIII identificou a INV-22 como causa do fenótipo de hemofilia A grave.

Paciente IA-3: N.T.S. masculino, pardo, 31 anos de idade, natural e procedente de Caraguatatuba, SP. A análise molecular do gene do FVIII identificou a INV-22 como causa do fenótipo de hemofilia A grave.

Paciente IA-4: E.J.G. masculino, caucasóide, 33 anos de idade, natural e procedente de Campinas, SP. Foi diagnosticado com HAG ao nascimento. A análise

molecular do gene do FVIII identificou a INV-22 como causa do fenótipo de hemofilia A grave.

Paciente IA-5: J.C. masculino, caucasóide, 78 anos de idade, natural e procedente sem informação. Foi diagnosticado com HAG ao nascimento. A análise molecular do gene do FVIII identificou a INV-22 como causa do fenótipo de hemofilia A grave.

5.6.3. Resultados da análise de expressão gênica por *bioarrays*.

Os dados extraídos de cada *bioarray* de cada paciente com inibidor foram comparados com os dados extraídos do *bioarray* de seu par correspondente, no caso de membros de uma mesma família, ou entre os grupos de pacientes não relacionados com e sem inibidor. Os genes que apresentaram um índice de expressão igual ou superior a duas vezes nos pacientes com inibidores e nos sem inibidores foram selecionados.

5.6.3.1. Resultados obtidos com pares de mesma família.

Os dados obtidos de cada par de uma mesma família discordante para a presença de inibidores foram comparados entre si (PAR 1 X PAR 2 X PAR 3 X PAR 4). Após a análise comparativa foram selecionados 292 genes de interesse, onde 123 deles foram mais expressos entre os indivíduos com inibidor e 169 genes foram mais expressos entre os indivíduos sem inibidor (Figura 28).

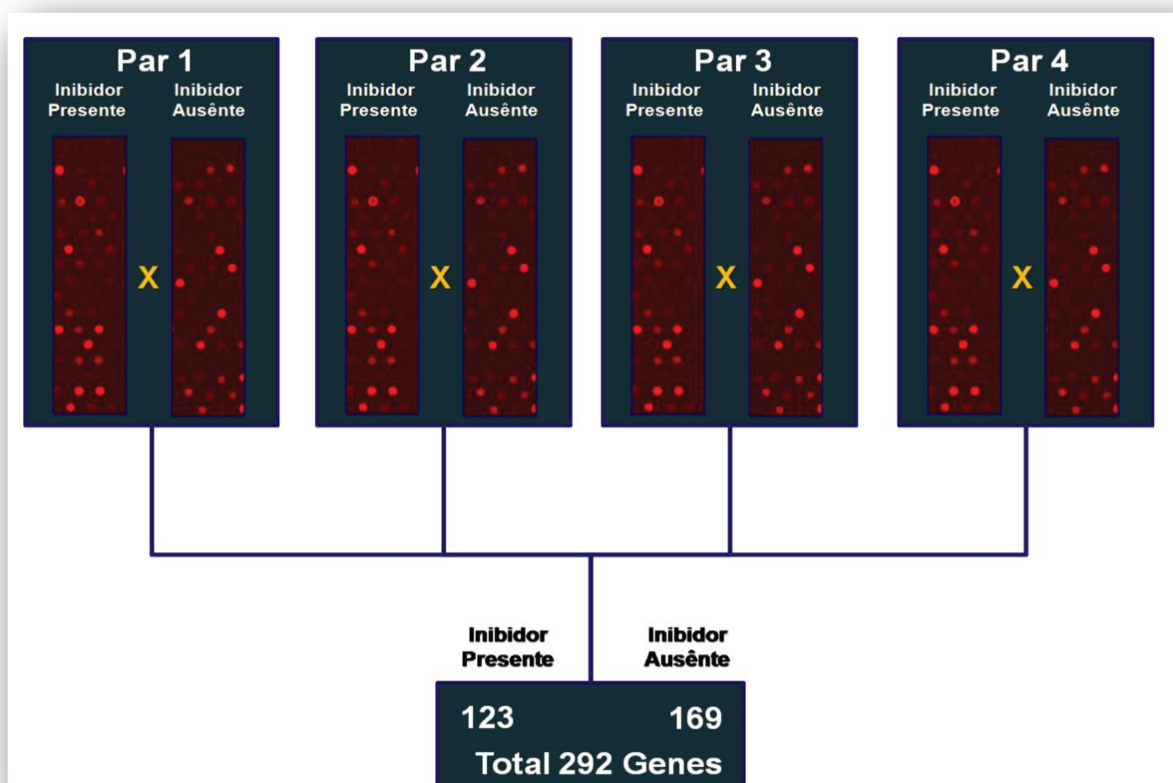


Figura 28. Representação da análise comparativa de expressão entre os pares de mesma família discordantes para a presença de inibidores. Os dados obtidos por meio da análise de bioarray de cada par de uma mesma família discordante para a presença de inibidores foram comparados entre si (PAR 1 X PAR 2 X PAR 3 X PAR 4). Após a análise comparativa foram selecionados 292 genes de interesse, onde 123 deles foram mais expressos entre os indivíduos com inibidor e 169 genes foram mais expressos entre os indivíduos sem inibidor

5.6.3.2. Resultados obtidos na comparação de grupos de pacientes não relacionados.

Com relação a análise de expressão gênica entre pacientes não relacionados com presença ou ausência de inibidores, foram realizadas novas hibridizações, utilizando amostras de RNA em “pool” de cinco pacientes com a presença de inibidor (grupo 1) e um “pool” de quatro pacientes onde inibidor foi ausente (grupo 2) (

Tabela 15).

O objetivo nessa avaliação foi verificar se os dados obtidos foram compatíveis com os já observados na análise dos *bioarrays* entre os pares relacionados discordantes para a presença de inibidores (Figura 29). Com base na análise comparativa foi possível selecionar 66 genes, 50 genes apresentaram uma expressão mais elevada entre os pacientes com presença de inibidor e 16 genes entre os pacientes com ausência de inibidores (**Tabela 16**). Para a identificação desses genes, relatamos de acordo com seu número de acesso no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*; www.ncbi.nlm.nih.gov).

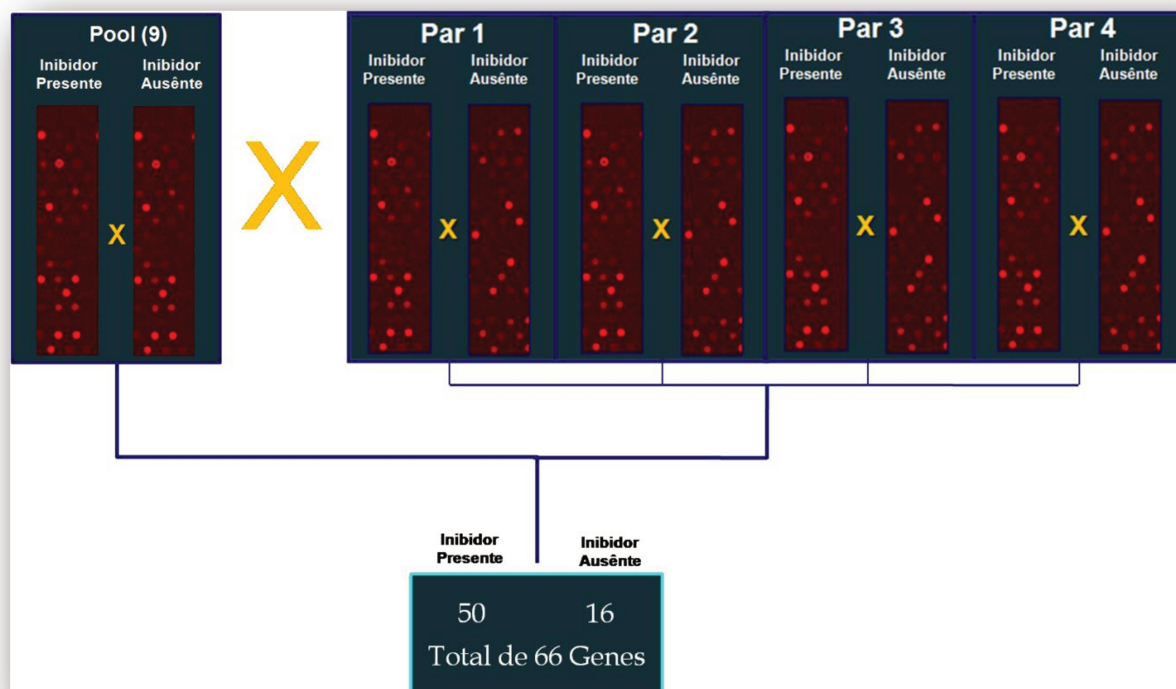


Figura 29. Representação da análise comparativa final da triagem de genes utilizando *bioarrays*. Os resultados obtidos com análise dos pares de mesma família discordantes para a presença de inibidores foi correlacionada aos dados obtidos na análise comparativa entre os grupos de pacientes não relacionados com presença e ausência de inibidores. Foi possível selecionar 66 genes, 50 genes apresentaram uma expressão mais elevada entre os pacientes com presença de inibidor e 16 genes entre os pacientes com ausência de inibidores

Tabela 16. Genes selecionados por meio da análise comparativa dos dados obtidos na plataforma Codelink e suas respectivas razões lineares.

Razão linear	Descrição do gene
-8,88	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39) (CHI3L1)
-4,18	fh11b09y1 NIH_MGC_17 cDNA clone IMAGE:2964448 3'
-4,09	AGENCOURT_10014211 NIH_MGC_142 cDNA clone IMAGE:6498368 5'
-3,23	ghrelin precursor (GHRL), mRNA
-3,17	UI-H-BW1-anu-e-05-0-Uls1 NCI_CGAP_Sub7 cDNA clone IMAGE:3083601 3'(similar to SUMO-protein E3)
-2,65	annexin A3 (ANXA3)
-2,46	wq57b08.x1 NCI_CGAP_GC6 cDNA clone IMAGE:2475351 3'
-2,43	hypothetical protein FLJ31978 (FLJ31978)
-2,43	GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP)
-2,42	atonal homolog 8 (Drosophila) (ATOH8)
-2,31	yd87d07s1 Soares fetal liver spleen 1NFLS cDNA clone IMAGE:115213 3'
-2,25	UI-H-BI0-aam-c-06-0-Uls1 NCI_CGAP_Sub1 cDNA clone IMAGE:2709874 3'
-2,23	oq43h01s1 NCI_CGAP_Kid5 cDNA clone IMAGE:1589137 3' similar to SW:NUCM_BOVIN P17694 NADH-UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE 49 KD SUBUNIT ;
-2,17	phosphatidylserine decarboxylase (PISD)
-2,16	DAP-1 alpha [Homo sapiens]
2,00	granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3) (GZMA)
2,03	transducer of regulated cAMP response element-binding protein (CREB) 3 (TORC3)
2,03	WD repeat and FYVE domain containing 1 (WDFY1)
2,06	chromosome 7 open reading frame 23 (C7orf23)
2,09	protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor gamma (PKIG), transcript variant 2
2,10	tumor protein, translationally-controlled 1 (TPT1)
2,16	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide K, 70kDa (POLR2K)

2,17 hypothetical protein MGC33414 (MGC33414)
 2,17 placenta-specific 8 (PLAC8)
 2,17 yf40a03r1 Soares fetal liver spleen 1NFLS cDNA clone IMAGE:129292 5'
 2,18 retinol dehydrogenase 13 (all-trans and 9-cis) (RDH13)
 2,18 ribosomal protein L14 (RPL14)
 2,19 hypothetical protein MGC33365 (MGC33365)
 2,19 major histocompatibility complex, class II, DM alpha (HLA-DMA)
 2,19 chromosome 19 open reading frame 2 (C19orf2), transcript variant 1
 2,19 monocyte to macrophage differentiation-associated (MMD)
 2,23 phosphodiesterase 4A, cAMP-specific (phosphodiesterase E2 dunce
 homolog, Drosophila) (PDE4A)
 2,24 ring finger and KH domain containing 2 (RKHD2)
 2,25 UI-H-BW1-amj-e-12-0-UIs1 NCI_CGAP_Sub7 cDNA clone IMAGE:3070175
 3' (EST similar to WHDC1L2)
 2,26 602352845F1 NIH_MGC_90 cDNA clone IMAGE:4451051 5'
 2,27 au72e05.y1 Schneider fetal brain 00004 cDNA clone IMAGE:2781824 5'
 similar to contains L1.t3 L1 repetitive element ; (EST similar to ARP2/3)
 2,28 th95h03x1 Soares_NSF_F8_9W_OT_PA_P_S1 cDNA clone
 IMAGE:2126453 3'(EST similar to alpha galactosyltransferase)
 2,30 602364606F1 NIH_MGC_90 cDNA clone IMAGE:4472977 5'
 2,31 chromosome 22 open reading frame 20 (C22orf20)
 2,32 family with sequence similarity 33, member A (FAM33A)
 2,36 nucleobindin 1 (NUCB1)
 2,37 Sec61 gamma subunit (SEC61G)
 2,39 mRNA; cDNA DKFZp686L20185 (from clone DKFZp686L20185)
 2,41 DC13 protein (DC13)
 2,43 ow67a11x1 Soares_fetal_liver_spleen_1NFLS_S1 cDNA clone
 IMAGE:1651868 3'(EST similar to glycophorin A)
 2,44 mitochondrial ribosomal protein L16 (MRPL16), nuclear gene encoding
 mitochondrial protein
 2,45 cDNA: FLJ21893 fis, clone HEP03412
 2,46 dual specificity phosphatase 2 (DUSP2)

2,53	S-phase kinase-associated protein 1A (p19A) (SKP1A), transcript variant 1
2,61	heat shock 70kDa protein 8 (HSPA8), transcript variant 1
2,61	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 18 (brain-derived) (PTPN18)
2,73	interleukin 18 receptor accessory protein (IL18RAP)
2,76	hypothetical protein FLJ20551 (FLJ20551)
2,79	calcium/calmodulin-dependent protein kinase I (CAMK1)
2,80	split hand/foot malformation (ectrodactyly) type 1 (SHFM1)
2,82	cystatin F (leukocystatin) (CST7)
2,90	zo96g11s1 Stratagene ovarian cancer (#937219) cDNA clone IMAGE:594788 3'
3,00	interleukin 10 receptor, alpha (IL-10RA)
3,31	mitochondrial ribosomal protein S16 (MRPS16), nuclear gene encoding mitochondrial protein oh55f06s1 NCI_CGAP_GC4 cDNA clone IMAGE:1470563 3' similar to
3,44	gb:X17115 IG MU CHAIN C REGION (HUMAN); (EST similar to polimorphic segment of VH chain of Ig)
3,45	cDNA FLJ32496 fis, clone SKNSH2000245
3,75	mitochondrial ribosomal protein L37 (MRPL37), nuclear gene encoding mitochondrial protein
3,77	lysophospholipase 3 (lysosomal phospholipase A2) (LYPLA3)
4,51	CD3Z antigen, zeta polypeptide (TiT3 complex) (CD3Z), transcript variant 1
5,51	killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1 (KLRD1), transcript variant 1
21,54	MHC class II HLA-DQA1 mRNA

- genes mais expressos em pacientes sem inibidores

5.6.4. Resultados da análise de expressão gênica através do uso de RT-PCR.

Dentre os 66 genes selecionados por meio da plataforma Codelink, foram escolhidos 6 genes (CAMK1, CST7, IL18RAP, LYPLA3, IL-10, PDE4A) para confirmação da expressão gênica diferencial através do uso do RT-PCR. Além dos seis genes selecionados baseados no resultado dos *bioarrays*, foram selecionados

outros quatro genes descritos em outros estudos (IL-8, C4BPA, CXCL9, PTGS1) (Hwang *et al.*, 2008) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>).

5.6.4.1. Descrição dos genes selecionados para análise através do uso de RT-PCR.

CAMK1 (NM_003656)

Proteína quinase tipo 1 dependente de cálcio-calmodulina é expresso em muitos tecidos e é um componente da cascata de proteína quinase dependente de calmodulina. A família do Ca (2 +) / calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) é ativado em resposta à elevação do cálcio intracelular (2 +), e inclui CaMK1 (bem como CaMK2 e CaMK4), que possui isoformas diferentes (alfa, beta, gama e delta). CaMK1 está presente em diversos tipos de células e pode estar envolvida em vários processos celulares. CaMK1 e 2 são expressas em células de câncer de endométrio e se correlaciona com o potencial de malignização deste tumor (Takai *et al.*, 2009)

CST7: NM_003650

Cistatina F. As cistatinas são uma família de inibidores de protease, compreendendo pelo menos 11 membros. Alguns são expressos no citoplasma, mas a maioria são seqüências sinalizadoras na via secretora. Cistatinas foram encontrados em muitos fluidos corporais diferentes, indicando que elas possuem um papel na regulação da protease no meio extracelular. Acredita-se que as cistatinas são secretadas para o espaço extracelular para inibir proteases que podem ser inadvertidamente liberadas pelas células. (Colbert *et al.*, 2009). Cystatin F é um inibidor de protease de cisteína, que é seletivamente expresso em células do sistema imunológico. Sendo a catepsina C o alvo principal da CST7, pode regular diversas funções efetoras de células imunes (Hamilton *et al.*, 2008).

IL18RAP: NM_003853

Receptor acessório para a interleucina 18 (IL18) A IL18 possui um papel importante e inovador na imunomodulação (Thompson & Humphries, 2007). IL-18 é uma

citocina pleiotrópica envolvida na regulação da imunidade inata e adaptativa. Ela desempenha um papel-chave nas doenças auto-imunes, inflamatórias e infecciosas, atuando através de um complexo receptor que se assemelha ao receptor da IL-1, consistindo de uma proteína de ligação, IL-18Ralpha, e uma proteína acessória, IL-18RAP (IL-18Rbeta). IL-18RAP é essencial para a transdução de sinal da IL-18 e a afinidade de ligação ao ligante IL-18Ralpha na cadeia receptora (Grisoni *et al.*; 2009).

LYPLA3: NM_012320.2

Lisofosfolipase 3 (*lysosomal phospholipase A2*). Este gene está localizado na região 16 do braço longo do cromossomo 16. As lisofosfolipases (LPLA) são enzimas que atuam nas membranas biológicas para regular os lisofosfolídeos multifuncionais. A proteína codificada por este gene hidrolisa lisofosfolídeos em glicerofosforilcolina e um ácido graxo livre. Essa enzima está presente no plasma e pode estar associada com lipoproteínas de alta densidade. Os estudos contradizem sobre a função desse gene demonstrando que codifica uma enzima lisossomal em vez de uma lisofosfolipase e tem ambas atividades de fosfolipases cálcio-independente A2 e da transacilase. Abe *et al.* (2004) demonstraram que as células THP-1 quando estimuladas com forbol éster adquirem propriedade semelhantes à de macrófagos e há um aumento na expressão de LPLA.

IL-10: NM_000572.2

Interleucina 10. Este gene, apesar de apresentar uma expressão elevada em três dos quatro pacientes com inibidor, foi selecionado, pois existem estudos (Astermark *et al.*, 2006) que demonstram que a interleucina 10 está envolvida com a formação de inibidores e desta forma é importante a análise de sua expressão neste grupo de pacientes.

PDE4A: NM_001111307

Fosfodiesterases (PDE), regulam a concentração celular de nucleotídeos cíclicos e desempenham um papel na transdução de sinal. PDE4A é uma classe IV cAMP-PDE específicas (Milatovich *et al.*, 1994). Segundo Dong *et al.* (2009) inibidores seletivos da PDE3, PDE4 ou PDE7 sozinhos produzem pouco efeito sobre a viabilidade das células, mas a inibição de todos os três juntos aumenta drasticamente a apoptose induzida por glicocorticóides em linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda humana (CEM).

IL-8: NM_000584

Interleucina-8 é um membro da família quimiocinas CXC. Estas proteínas possuem um papel pró-inflamatório e principalmente de mediar a ativação e migração de neutrófilos em tecido a partir de sangue periférico.

C4BPA: NM_000715

Cadeia alfa da proteína de ligação do componente 4 do complemento induz a proliferação e expressão de CD54 e CD86 e IL4-dependente e isotipo IgE.

CXCL9: NM_002416

Quimiocina CXC ligante 9. Esse gene pertence a família das quimiocinas, o qual também desempenha papel fundamental no desenvolvimento, homeostase e funções do sistema imunológico, e que têm efeitos sobre as células do sistema nervoso central.

PTGS1: NM_080591

Prostaglandina sintetase endoperóxido (PTGS), também conhecida como cicloxigenase, é a enzima chave na biossíntese de prostaglandina, e atua tanto como uma dioxigenase e como uma peroxidase. Há duas isoenzimas da PTGS: uma PTGS1 constitutiva e um PTGS2 induzida, que diferem na sua regulação da

expressão e distribuição tecidual. PTGS1 regula a angiogênese em células endoteliais e é inibida por antiinflamatórios não esteróides, como a aspirina. PTGS1 parece estar envolvida em sinalização de célula-célula e manutenção da homeostase do tecido. Splicing alternativo do gene gera duas variantes de transcrição e a expressão dessas duas transcrições é diferencialmente regulada por citocinas e fatores de crescimento.

5.6.4.2. Resultados obtidos pela análise por RT-PCR.

A expressão dos genes LYPLA3, CAMK1, PDE4A, CST7, IL18RAP, PTGS1 IL-10, C4BPA, CXCL9 e IL-8 foi avaliada em 10 pacientes HA graves não relacionados sendo cinco pacientes com presença de inibidores e cinco pacientes HA graves sem inibidores. Amostras de RNA extraídas de células mononucleares circulantes foram obtidas dos pacientes de acordo com os dados presentes na

Tabela 15.

Apenas três genes apresentaram diferença estatisticamente significativa (valor de $P < 0,05$) sendo eles: IL-10 (Figura 30), IL-8 (Figura 31) e CST7 (Figura 32). Os demais genes não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre o grupo de pacientes com e sem inibidores (Figuras 33, 34, 35, 36, 37, 38 e 39).

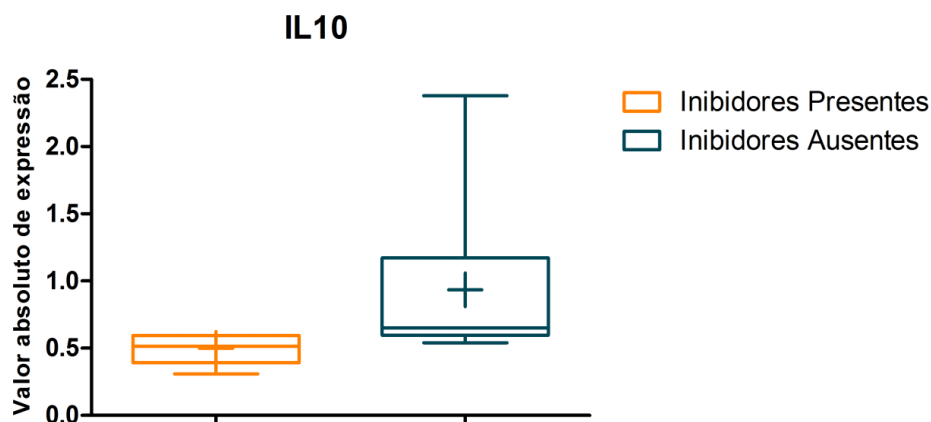


Figura 30. Representação gráfica comparativa da mediana da expressão do gene IL-10 no grupo de pacientes com presença e ausência de inibidores. A caixa representa 50% dos dados centrais, o traço horizontal representam a mediana, e as linhas externas os valores máximo e mínimo. O símbolo + representa o valor da média. Valor de $P = 0,008$.

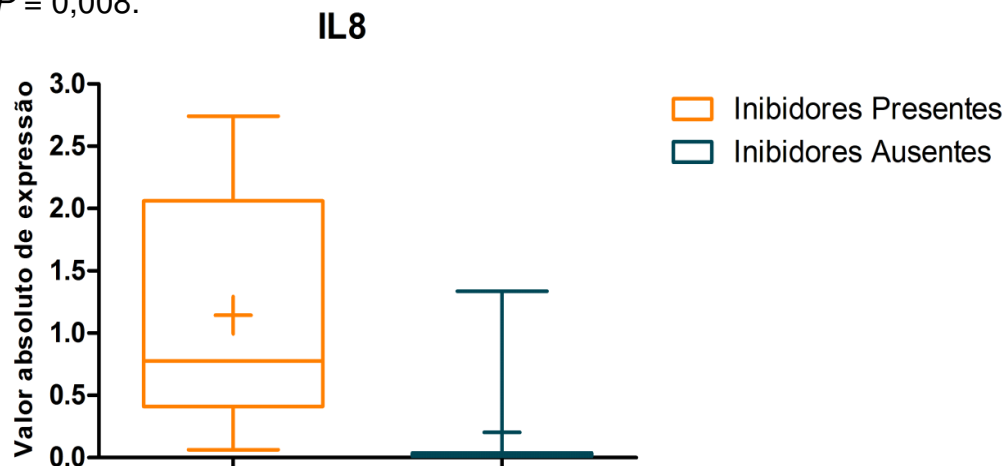


Figura 31. Representação gráfica comparativa da mediana da expressão do gene IL-8 no grupo de pacientes com presença e ausência de inibidores. A caixa representa 50% dos dados centrais, o traço horizontal dentro da caixa representa a mediana, e as linhas externas os valores máximo e mínimo. O símbolo + representa o valor da média. Valor de $P = 0,0015$.

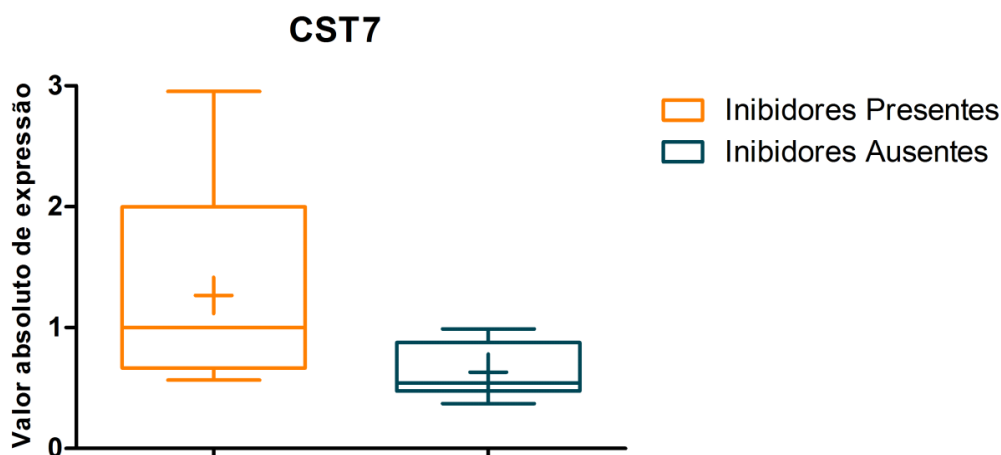


Figura 32. Representação gráfica comparativa da mediana da expressão do gene CST7 no grupo de pacientes com presença e ausência de inibidores. A caixa representa 50% dos dados centrais, o traço horizontal dentro da caixa representa a mediana, e as linhas externas os valores máximo e mínimo. O símbolo + representa o valor da média. Valor de $P = 0,025$.

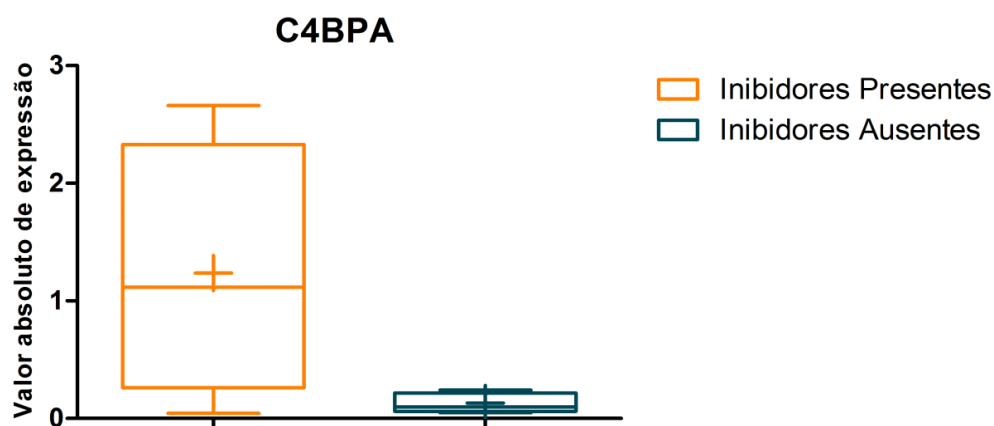


Figura 33. Representação gráfica comparativa da mediana da expressão do gene C4BPA no grupo de pacientes com presença e ausência de inibidores. A caixa representa 50% dos dados centrais, o traço horizontal dentro da caixa representa a mediana, e as linhas externas os valores máximo e mínimo. O símbolo + representa o valor da média. Valor de $P = 0,14$.

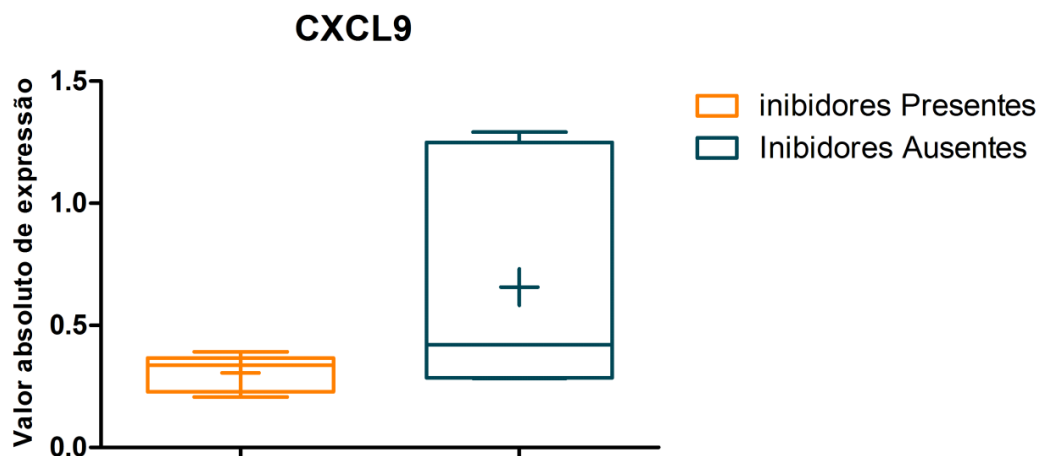


Figura 34. Representação gráfica comparativa da mediana da expressão do gene CXCL9 no grupo de pacientes com presença e ausência de inibidores. A caixa representa 50% dos dados centrais, o traço horizontal dentro da caixa representa a mediana, e as linhas externas os valores máximo e mínimo. O símbolo + representa o valor da média. Valor de $P=0,16$.

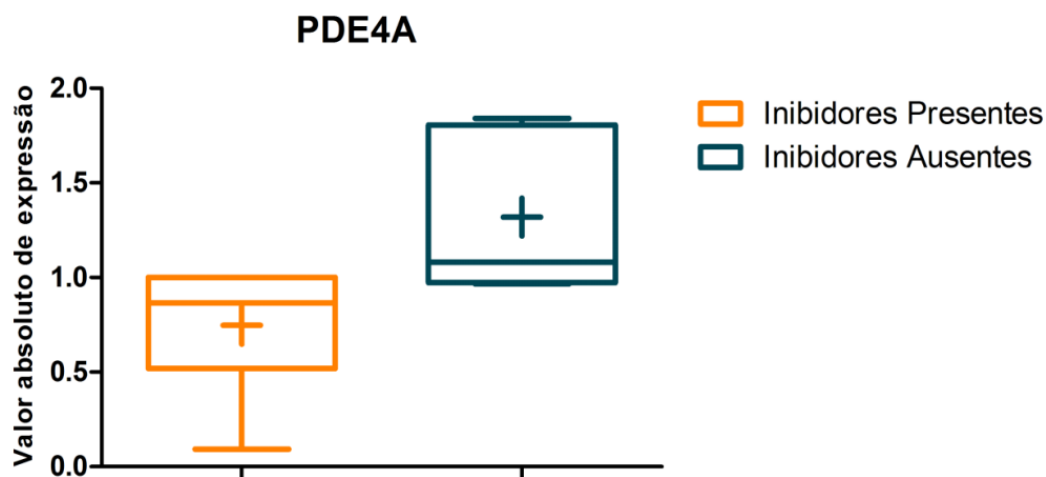


Figura 35. Representação gráfica comparativa da mediana da expressão do gene PDE4A no grupo de pacientes com presença e ausência de inibidores. A caixa representa 50% dos dados centrais, o traço horizontal dentro da caixa representa a mediana, e as linhas externas os valores máximo e mínimo. O símbolo + representa o valor da média. Valor de $P = 0,06$.

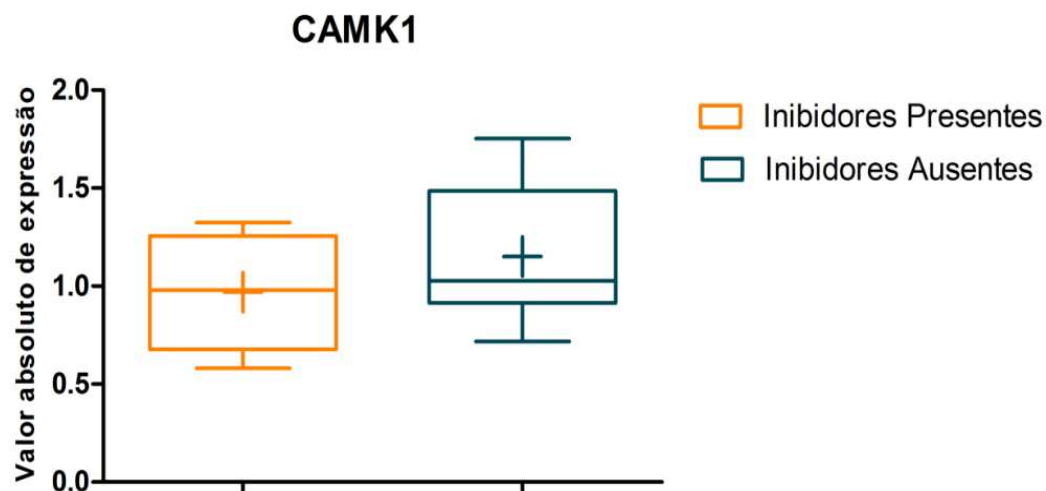


Figura 36. Representação gráfica comparativa da mediana da expressão do gene CAMK1 no grupo de pacientes com presença e ausência de inibidores. A caixa representa 50% dos dados centrais, o traço horizontal dentro da caixa representa a mediana, e as linhas externas os valores máximo e mínimo. O símbolo + representa o valor da média. * valor de $P = 0,21$.

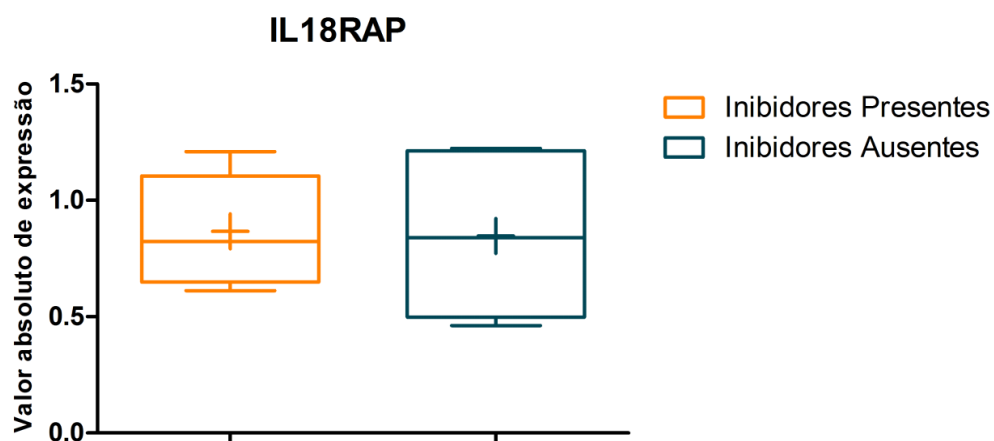


Figura 37. Representação gráfica comparativa da mediana da expressão do gene IL18RAP no grupo de pacientes com presença e ausência de inibidores. A caixa representa 50% dos dados centrais, o traço horizontal dentro da caixa representa a mediana, e as linhas externas os valores máximo e mínimo. O símbolo + representa o valor da média. Valor de $P = 0,53$.

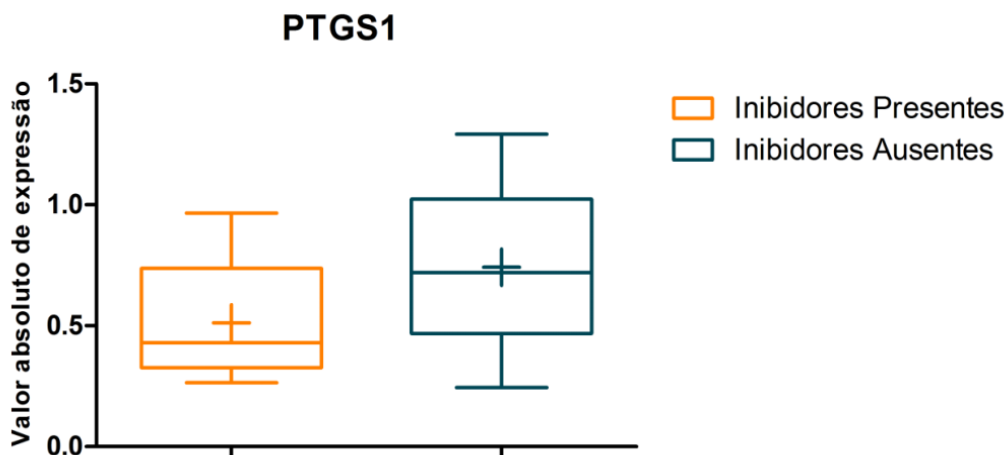


Figura 38. Representação gráfica comparativa da mediana da expressão do gene PTGS1 no grupo de pacientes com presença e ausência de inibidores. A caixa representa 50% dos dados centrais, o traço horizontal dentro da caixa representa a mediana, e as linhas externas os valores máximo e mínimo. O símbolo + representa o valor da média. Valor de $P = 0,16$.

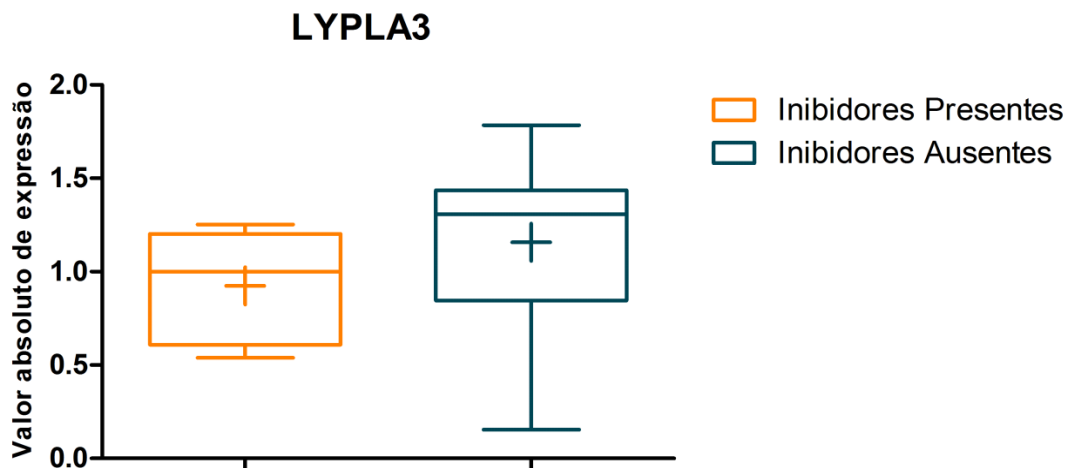


Figura 39. Representação gráfica comparativa da mediana da expressão do gene LYPLA3 no grupo de pacientes com presença e ausência de inibidores. A caixa representa 50% dos dados centrais, o traço horizontal dentro da caixa representa a mediana, e as linhas externas os valores máximo e mínimo. O símbolo + representa o valor da média. Valor de $P = 0,08$.

A análise da expressão gênica dos 10 genes analisados por RT-PCR encontra-se resumida na Figura 40.

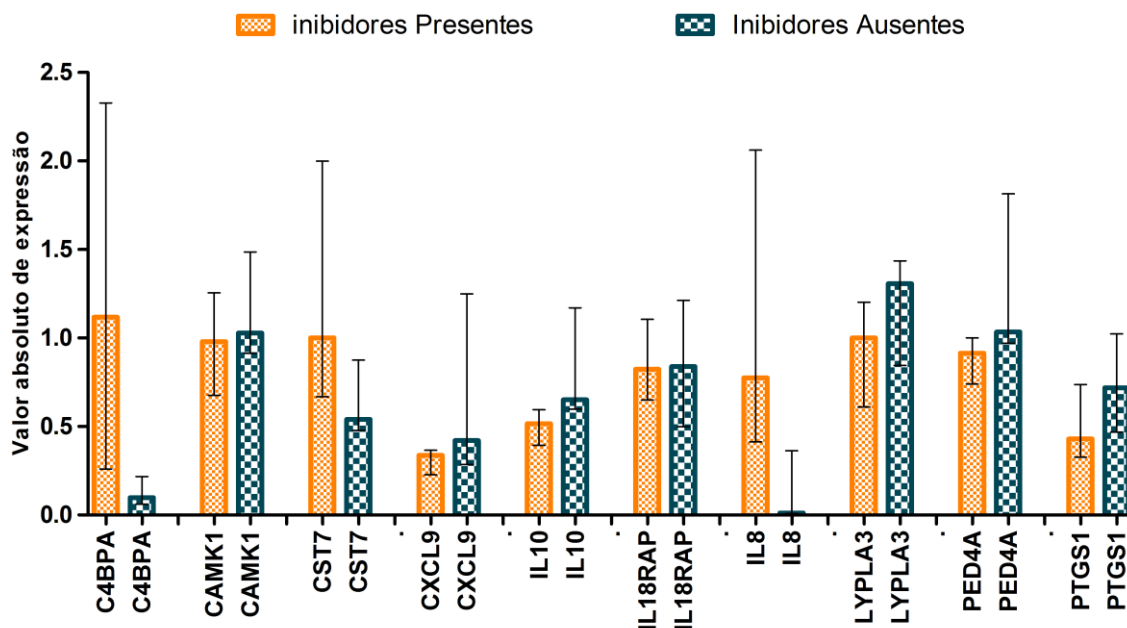


Figura 40. Representação gráfica comparativa da mediana da expressão de todos genes analisados. Representação gráfica comparativa da mediana da expressão de todos genes analisados por RT-PCR. A barra representa a mediana e as linhas externas os valores máximo e mínimo ($p < 0,05$).

Na Figura 41 está demonstrada a análise comparativa entre os genes IL-8 e IL-10 para cada paciente anteriormente analisado. Foi adicionado nesta análise um paciente (Figura 41, paciente AR-7) que embora pertencesse ao grupo de pacientes alto respondedor para inibidor, no momento da análise a quantificação do inibidor foi negativa. Desta forma, foi possível avaliar o padrão de expressão dos genes IL-10 e IL-8 para cada paciente e verificar a existência de uma possível associação entre estes genes. É importante notar que embora para a expressão de IL-8, o indivíduo AR-2 apresente como um *outlier*, mesmo com a exclusão desse paciente a expressão de IL-8 permanece estatisticamente superior no grupo com inibidor que sem inibidor ($P < 0,007$). O mesmo é observado para a análise da expressão de IL-10, sendo o indivíduo IA-1, do grupo sem inibidor, também é um *outlier*. Neste caso, após a exclusão do paciente IA-1

da análise a expressão de IL-10 permanece estatisticamente superior nesse grupo ($P < 0,037$).

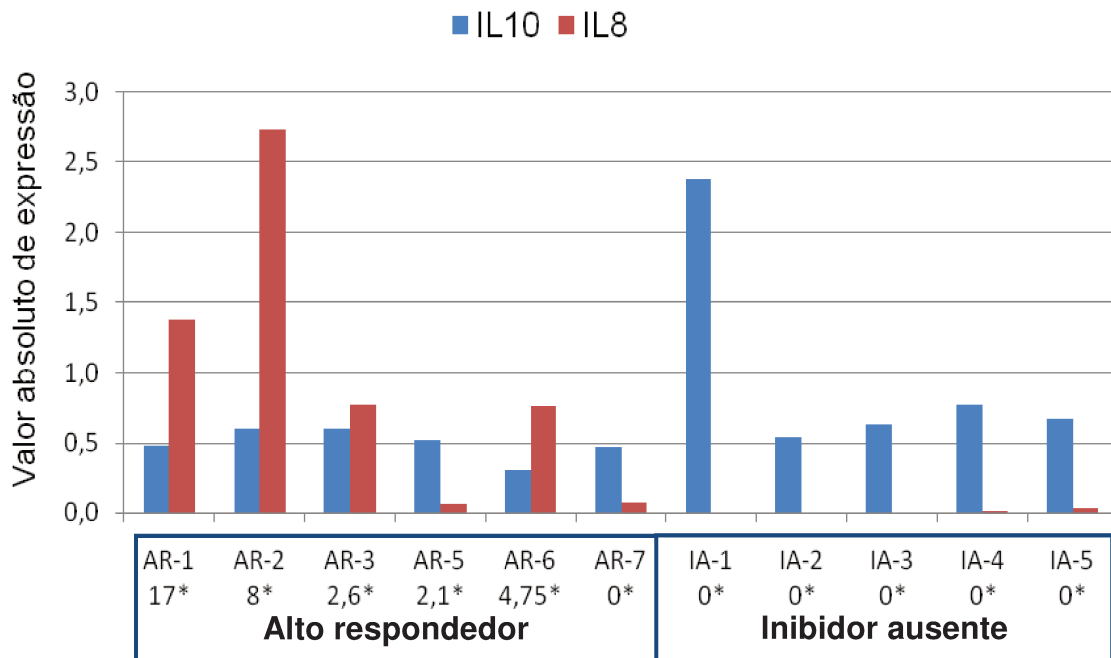


Figura 41. Representação gráfica da análise comparativa entre os genes IL-8 e IL-10 por paciente. Grupo alto respondedor: pacientes AR-1 ao AR-7. Grupo Inibidor ausente: pacientes IA-1 ao IA-5. *Resultado da quantificação do inibidor em UB/mL no momento da coleta do RNAm.

Na Figura 42 é demonstrada a análise de cada paciente, para os três genes em conjunto, IL-8, IL-10 e CST7, que apresentaram resultado estatisticamente significativo entre os grupos.

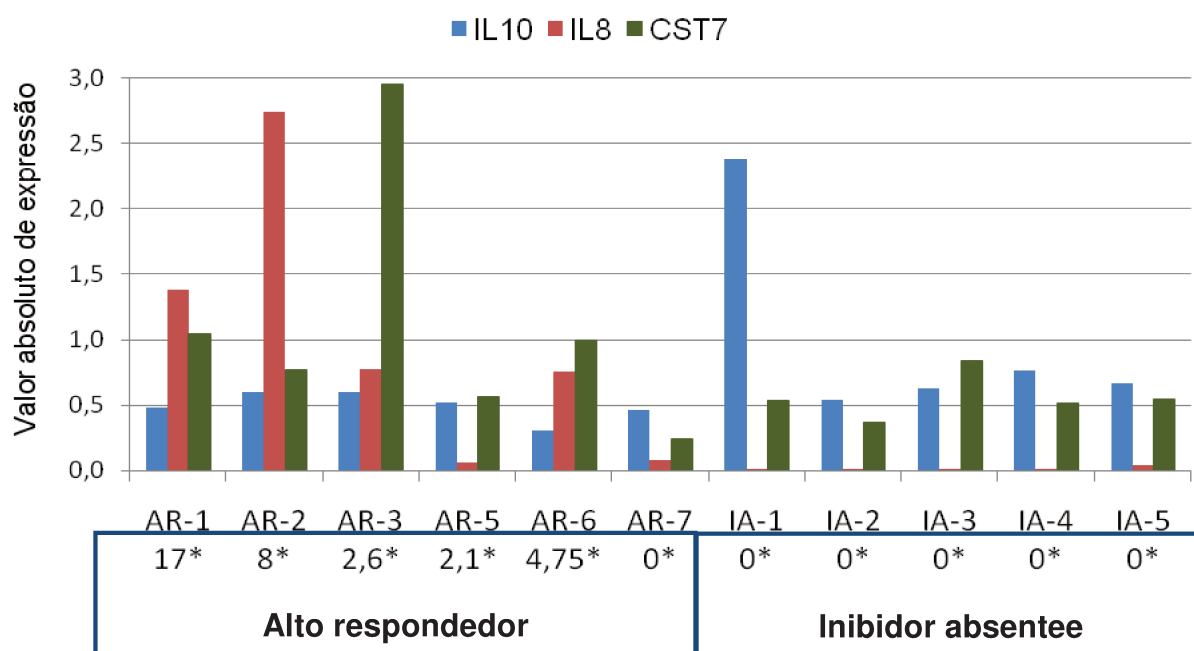


Figura 42. Representação gráfica da análise comparativa entre os genes IL-8, IL-10 e CST7 por paciente. Grupo alto respondedor: pacientes AR-1 ao AR-7. Grupo Inibidor ausente: pacientes IA-1 ao IA-5. *Resultado da quantificação do inibidor em UB/mL no momento da coleta do RNAm.

6. Discussão

O desenvolvimento de inibidor é considerado uma das complicações mais graves associadas à hemofilia (Darby *et al.*, 2004) Neste estudo foram incluídos pacientes hemofílicos das cinco regiões territoriais do Brasil com o objetivo de se analisar simultaneamente diferentes fatores de risco que pudessem estar correlacionados ao desenvolvimento de inibidores nessa população.

Uma das principais dificuldades desse estudo esteve relacionada com seu caráter multicêntrico, sendo um grande desafio a inclusão de casos de regiões distintas de forma representativa. Com exceção do estado de São Paulo, representado pelos pacientes provenientes do Hemocentro da UNICAMP e do estado do Acre (Hemoacre), onde cerca de 90% dos pacientes acompanhados em cada um dos centros foram incluídos, as demais regiões ainda estão sub-representadas com cerca de 5% a 30% dos casos acompanhados em cada um dos três centros nos estados da Bahia (Hemoba), Paraná (Hemepar) e Mato Grosso (Hemomat). Além da dificuldade na inclusão dos casos, devido parcialmente pela distância geográfica, outras questões técnicas, como armazenamento e transporte de amostras, sobretudo das amostras de plasma, representaram um fator limitante na inclusão de maior número de casos de algumas das regiões.

No total, foram incluídos nesse estudo 411 pacientes hemofílicos, sendo 321 com HA e 99 HB, pertencentes ao total de 238 e 59 famílias, respectivamente. Desses pacientes apenas 46 apresentaram inibidor detectado em pelo menos uma ocasião. Todos os casos com a presença de inibidor eram hemofílicos A graves e em 36 desses pacientes o inibidor foi de alta resposta. Isso representa uma incidência cumulativa de inibidor em 14,3% dos casos de HA (46 / 321) ou 20,9% (46 / 220) entre os pacientes hemofílicos A graves incluídos nesse estudo. Quando consideramos apenas os casos clinicamente significativos, ou seja, os pacientes com inibidor classificados como alto respondedores, a prevalência de inibidor foi de 12,3% entre os casos de HA grave, o que é o mesmo que o observado na maioria dos estudos em outras populações (Wight & Paisley, 2003).

Quando avaliamos o tipo de mutação presente e a ocorrência de inibidor, todos os casos onde a mutação pode ser determinada e que apresentaram inibidor detectável, essa mutação era considerada de alto risco para o desenvolvimento de inibidor. Por outro lado, quando analisamos a incidência de inibidor entre os casos que possuíam mutação no gene do FVIII considerada de alto risco para inibidor, ou seja, INV-1, INV-22, grandes deleções, mutações *nonsense*, pequenas inserções ou deleções fora de regiões com repetição de nucleotídeos A e mutações *missense* nos domínios A2, C1 e C2 (Oldenburg *et al.*, 2002), 26,4 % (33 / 125) desses pacientes desenvolveram inibidor.

Ao considerarmos o risco de desenvolvimento de inibidor de acordo com o grupo étnico, assim como em outras populações descritas (Aledort & DiMichele, 1996; Astermark *et al.*, 2001; Goudemand *et al.*, 2006; Viel, *et al.* 2009), observamos uma maior incidência entre os pacientes negros (31 %) quando comparados aos pacientes caucasóides (20%).

Recentemente foi proposto por Viel e cols. (2009) que a presença de haplótipos distintos do FVIII, pudesse ter correlação farmacogenética com o risco maior de inibidores em negros norte-americanos. Isso se deve ao fato dos haplótipos que aparecem exclusivamente na população negra (denominados H3 e H4), estarem ausentes nos concentrados de FVIII recombinantes utilizados rotineiramente no tratamento desses pacientes.

No Brasil, o tratamento de reposição para os hemofílicos A é realizado quase que exclusivamente com concentrado de FVIII derivado do plasma humano (pd-FVIII). Apesar disso, conforme observado nos pacientes incluídos neste estudo, observamos a maior incidência de inibidores entre a população negra. Realizamos a investigação para determinar se este fato também estava relacionado com a prevalência de diferentes haplótipos do gene do FVIII. No entanto, em nossa análise não houve correlação entre o desenvolvimento de inibidor e o genótipo do FVIII encontrado (Tabela 13) (Santos *et al.*, 2009). De fato, a prevalência desses haplótipos foi distinta entre a população brasileira estudada e a norte-americana descrita, tanto entre os negros, como entre os caucasóides. A diferença observada em relação aos negros pode ser explicada pelo

fato da imigração de negros para o Brasil era proveniente de áreas geográficas da África distintas das origens da população afrodescendente norte-americana. Isso é comprovado em diversos outros estudos populacionais como observado na origem dos pacientes falciformes brasileiros e norte-americanos (Figueiredo *et al.*, 1996). Em relação à diferença observada entre os grupos caucasóide brasileiro e norte-americano, é possível que seja influenciada pela grande miscigenação observada em nossa população. Embora os critérios adotados nesse estudo tenham sido rigorosos para a classificação étnica, levando-se em conta além das características físicas, a ancestralidade, é provável que a população caucasóide brasileira apresente características genótípicas distintas às outras populações.

Surpreendentemente, ao correlacionar a prevalência de inibidor e grupos étnicos, notamos que os pacientes classificados como pertencentes ao grupo dos índios brasileiros, a presença de inibidor foi notavelmente baixa, apenas 7% (1 / 13). Embora o número de pacientes neste grupo étnico tenha sido pequeno, é importante notar que não houve diferença em relação ao acesso ou ao tipo de tratamento de reposição que esses hemofílicos receberam, em comparação aos demais pacientes incluídos nesse estudo.

Um dos objetivos deste estudo foi a investigação de fatores de risco para o desenvolvimento de inibidor baseado na análise da expressão gênica de células mononucleares circulantes em pacientes com e sem inibidores. Inicialmente foi realizada a triagem dos genes com o uso de *biorrays* e posteriormente os genes selecionados foram avaliados pela técnica de RT-PCR.

A análise dos genes diferencialmente expressos entre os pacientes hemofílicos discordantes para presença de inibidores por meio da plataforma CodeLink foi realizada entre membros da mesma família e separadamente comparando-se grupos de pacientes não relacionados, com ou sem inibidores. Todos os casos que apresentavam inibidor eram classificados como alto respondedores. A triagem inicial resultou na seleção de 66 genes diferencialmente expressos. Desses 66 genes, 50 genes foram mais expressos entre os pacientes com presença de inibidores e 16 genes nos casos sem inibidores. Foram escolhidos seis genes para a validação por RT-PCR tendo como

critério para escolha, genes que poderiam estar relacionados com o sistema imune ainda com função desconhecida ou com seu papel já bem fundamentado no desenvolvimento de inibidores. Optou-se também pela escolha de mais quatro genes que tiveram sua expressão analisada entre grupos discordantes de pacientes hemofílicos A graves descritos em outros estudos (Hwang, et al. 2008).

Dentre os dez genes analisados, três apresentaram-se diferencialmente expressos entre os pacientes discordantes para presença de inibidor. O gene IL-10 apresentou uma maior expressão entre os pacientes com ausência de inibidor. O gene da IL-10 exerce tanto o efeito anti-inflamatório como imunorregulador sobre o sistema imunológico. IL-10 é secretada por células Th2 e estimula os linfócitos B à diferenciação e proliferação e assim produzem anticorpos. Ao mesmo tempo a IL-10 pode diminuir a expressão de citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e as interleucinas (IL) 1 α/β , IL-6 e IL-8 que estão envolvidas nos processos pró-inflamatórios (Lalani *et al.*, 1997). O gene da IL-10 possui um polimorfismo na região promotora (-1082 A/G), onde há um microssatélite de repetições CA com 134 pb. A presença do alelo G na posição -1082 está relacionada com elevação da expressão da IL-10. Alguns autores correlacionaram a presença desse polimorfismo com manifestações auto-imunes e maior concentração de auto-anticorpos no lupus eritematoso sistêmico (Houssiau et al., 1995), assim como maior produção de imunoglobulina monoclonal no mieloma múltiplo (Zheng et al., 2001). Recentemente foi descrita por Astermark e cols. (2006) que a presença do genótipo IL10G estaria relacionada ao desenvolvimento de inibidores. O mesmo não foi comprovado por outros autores (Bafunno, et al., 2009). Além disso, o estudo clínico de Astermark e cols. (2006) e posteriormente o estudo de Pavlova e cols. (2009), que também sugeriu que o alelo G estava mais relacionado ao desenvolvimento de inibidor, foram baseados exclusivamente na análise genotípica, sem a comprovação com a avaliação da expressão do RNAm ou na quantificação da citocina. Interessante notar que em nosso estudo a expressão da IL-10 foi menor em indivíduos com inibidor. De fato, nos estudos *in vitro* e em animais, evidenciaram que a produção elevada de IL-10 por células dendríticas (apresentadoras de antígeno) está relacionada com o desenvolvimento de tolerância ao FVIII, sobretudo na presença de TGF- β (fator de

crescimento de transformação beta) e portanto diminuição dos inibidores (Quadura et al., 2008).

Além da observação nesse estudo da menor expressão de IL-10 entre pacientes com inibidor, o que chamou a atenção foi a notável diferença da expressão da IL-8 entre o grupo de pacientes com inibidor, expressão essa praticamente ausente entre os pacientes sem inibidor e muito baixa entre os paciente alto repondedores que apresentavam inibidor não detectável ou próximo à 2 UB/mL (Figura 41, indivíduos AR-7 e AR-5 repectivamente). Nenhum trabalho anterior mostrou a associação da IL-8 e o desenvolvimento de inibidor. Da mesma maneira, não há claramente descrita uma associação da IL-8 e autoimunidade. A IL-8 está relacionada com inflamação e angiogênese (Koch *et al.*, 1992). Por esse motivo há correlação entre IL-8 e desenvolvimento de alteração vascular isquêmica (Keeley *et al.*, 2008), assim como tumorigênese (Strieter *et al.*, 2006). É interessante notar que nesse estudo a expressão de IL-10 foi oposta ao observado para IL-8, isto é, o grupo com inibidor evidenciou alta expressão de IL-8 e baixa de IL-10 e no grupo sem inibidor alta expressão de IL-10 e baixa de IL-8. De fato, é descrito que IL-10 pode inibir a expressão de IL-8 (Lalani *et al.*, 1997). Portanto, isso sugere uma correlação entre essas duas interleucinas entre esses grupos. A participação da IL-8 no desenvolvimento de inibidor ainda precisa ser esclarecida. Embora nesse estudo o número de casos analisados seja pequeno, é importante notar a clara relação não só da expressão elevada de IL-8 no grupo alto respondedor para inibidor, assim como, a redução de expressão nos casos onde embora alto respondedores, a detecção de inibidor foi baixa ou ausente. Essa correlação deverá ainda ser esclarecida. Para o seguimento dessa análise estamos coletando amostras na evolução desses casos já analisados, assim como, incluindo outros pacientes para essa mesma análise, associada à quantificação do perfil de interleucinas com e sem a presença de inibidores.

O gene da CST-7 (cistatina F ou leucocistatina) é expresso em muitas células do sistema imune. A cistatina F é um inibidor de cisteína-protease, que é seletivamente expresso em células do sistema imunológico. Sendo a catepsina C o alvo principal da

CST7, regulando assim diversas funções efectoras de células imunes (Hamilton, *et al.*; 2008). A expressão da cistatina F foi estatisticamente maior no grupo de pacientes com inibidor. Essa associação nunca foi descrita na literatura. Até o momento não foi possível definirmos qual a via pela qual essa associação acontece. Além disso, não é possível determinar se a elevação na expressão da CST7 tem correlação com o aumento da IL-8 e diminuição da IL-10 nesse mesmo grupo.

Em resumo nossos resultados fortalecem a idéia de que o mecanismo de desenvolvimento de inibidores em hemofilia é complexo e ainda não totalmente esclarecido. Há potencialmente outras vias e portanto, outros genes que podem estar envolvidos nesse processo. O estudo em diferentes populações é uma importante etapa para o entendimento desses fatores de risco e deverá ajudar no futuro a determinar um tratamento diferenciado para o controle e sobretudo prevenção do desenvolvimento de inibidores. Este foi um estudo pioneiro realizado no Brasil, incluindo pacientes de diversas regiões e analisando simultaneamente diferentes fatores que possam estar envolvidos com o desenvolvimento de inibidores em hemofilia.

7. Conclusão

7. CONCLUSÃO

A partir deste estudo é possível concluir que:

- Em relação aos dados epidemiológicos do desenvolvimento de inibidores em hemofílicos nessa população brasileira estudada:
 - A prevalência de inibidores nos pacientes hemofílicos A grave foi maior entre os pacientes negros em comparação aos demais grupos étnicos.
 - A maior incidência de inibidores entre os hemofílicos de etnia negra não foi associada aos haplótipos do FVIII, como observado em norteamericanos.
 - Pacientes hemofílicos com antecedente indígena apresentaram uma incidência consideravelmente menor para desenvolvimento de inibidor.
 - As mutações encontradas entre os pacientes com inibidor foram todas pertencentes ao grupo de mutações de alto risco para desenvolvimento de inibidor.
- Em relação ao estudo de fatores de risco para o desenvolvimento de inibidores baseado na avaliação da expressão gênica de células mononucleares circulantes:
 - A triagem utilizando *bioarrays* em amostras de pacientes relacionados (pares discordantes de mesma família) e não relacionados, resultou em 66 genes diferentemente expressos entre os grupos com e sem inibidores.
 - Foram selecionados dez genes para a avaliação pelo método de RT-PCR, onde três genes (IL-10, IL-8 e CST7) apresentaram expressão estatisticamente diferente entre os grupos.
 - A IL-10 apresentou menor expressão entre os pacientes sem inibidor. Embora este resultado nunca tenha sido descrito em estudos clínicos

anteriores, nossos resultados são compatíveis com o efeito da IL-10 em estudos *in vitro* e em animais.

- A IL-8 foi significativamente mais expressa no grupo de pacientes com inibidores. Esta é uma correlação nunca antes descrita. É possível que um novo mecanismo esteja também envolvido no desenvolvimento de inibidores.
- A cistatina F foi estatisticamente mais expressa em pacientes com inibidores. Sua participação nesse evento deverá ser esclarecida com estudos futuros sobre esse assunto.

8. Referências Bibliográficas

Abe, A; Hiraoka, M; Wild, S; Wilcoxon, SE; Paine, R 3rd; Shayman, JA. Lysosomal phospholipase A2 is selectively expressed in alveolar macrophages. **J Biol Chem.** 279(41):42605-11, 2004.

Aledort, LM & Dimichele, DM. Inhibitors occur more frequently in African-American and Latino haemophiliacs. **Haemophilia.**1:68, 1998

Antonarakis, SE; Rossiter, JP; Young, M *et al.* Factor VIII gene inversions in severe haemophilia A: results of an international consortium study. **Blood**; 86: 2206–12,1995.

Antunes, SV. Haemophilia in the developing world: the Brazilian experience. **Haemophilia.**; 8: 199-204, 2002.

Arruda, VR; Pieneman, WC; Reitsma, PH; Deutz-Terlouw, PP; Annichino-Bizzacchi, JM; Briet, E; Costa, FF. Eleven novel mutations in the factor VIII gene from Brazilian hemophilia A patients. **Blood.** 86:3015-20, 1995.

Astermark, J; Berntorp, E; White, GC; Kroner, BL. The Malmö International Brother Study (MIBS): further support for genetic predisposition to inhibitor development in hemophilia patients. **Haemophilia.** 7:267-72, 2001.

J, ASTERMARK. Why do inhibitors develop? Principles of and factors influencing the risk for inhibitor development in haemophilia. **Haemophilia.** 12(3), 52–60, 2006.

Astermark, J; Oldenburg, J; Pavlova, A; Berntorp, E; Lefvert, AK; MIBS Study Group. Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. **Blood.** 15;107(8):3167-72. 2006

Auffray, I; Martafia, S; Jong, L; Lee, G; Huang, C; Pasztyet, C; *et al.* Glycophorin A dimerization and band 3 interaction during erythroid membrane biogenesis: in vivo studies in human glycophorin A transgenic mice. **Blood.** 97:2872-8, 2001.

Bafunno, V; Santacroce, R; Chetta, M; D'Andrea' G; Pisanelli, D; Sessa, F; Trotta, T; Tagariello, G; Peyvandi, F; Margaglione, M. Polymorphisms in genes involved in autoimmune disease and the risk of FVIII inhibitor development in Italian patients with haemophilia A. **Haemophilia**. (Published Online)1-5, 2009.

Bagnall, RD; Wasseem, N; Green, PM; Giannelli, F. Recurrent inversion breaking íntron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. **Blood**; 99:168-74, 2002.

Blom AM. Structural and functional studies of complement inhibitor C4b-binding protein. **Biochem Soc Trans**. 30(6):978-82, 2002.

Bowen, DJ. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. **Mol Pathol**; 55:1-18, 2002.

Boyüm, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood: isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. **Scand J Clin Lab Invest Suppl.**;97:77-89, 1968.

Bray, GL; Compersts, ED; Courter, S. *et al.* A Multicenter study of recombinant factor VIII (recombinate): safety efficacy, and inhibitor risk in previously untreated patients with hemophilia A. The recombinate Study Group. **Blood**; 83:2428-35, 1994.

BUSTIN, SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol**. 25:169-93, 2000.

Chereau, D; Kerff, F; Graceffa, P; Grabarek, Z; Langsetmo, K; Dominguez, R; Actin-bound structures of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-homology domain 2 and

the implications for filament assembly. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 102(46):16644-9, 2005.

Choo KH, Gould KG, Rees DJ, Brownlee GG. Molecular cloning of the gene for human anti-haemophilic factor IX. **Nature** 1982;299:178-80.

Colbert, JD; Plechanovová, A; Watts, C. Glycosylation Directs Targeting and Activation of Cystatin F from Intracellular and Extracellular Sources. **Traffic.** 10(4): 425–437, 2009

Crossley, M; Michael, L; Stowell, KM; de Vos P; Olek, K; George G. Brownlee. "Recovery from hemophilia B Leyden: an androgen-responsive element in the factor IX promoter. " **Science**, 257 (3) 377, 1992.

Darby S.C.; Keeling D.M.; Spooner R.J.D.; Wan Kan S.; Giangrande P.L.F.; Collins P.W.; Hill F.G.H.; Hay C.R.M. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 2,(7)1047-1054, 2004.

Dhingra, S; Sharma, AK; Arora, RC; Slezak, J; Singal PK. IL-10 attenuates TNF-alpha-induced NF kappaB pathway activation and cardiomyocyte apoptosis. **Cardiovasc Res.** 1;82(1):59-66, 2009.

Dimichele D. Inhibitors: resolving diagnostic and therapeutic dilemmas. **Haemophilia**; 8:280-7, 2002.

Dong, H; Zitt, C; Auriga, C; Hatzelmann, A; Epstein, PM. Inhibition of PDE3, PDE4 and PDE7 potentiates glucocorticoid-induced apoptosis and overcomes glucocorticoid resistance in CEM T leukemic cells. **Biochem Pharmacol.** 1;79(3):321-9, 2009.

Ehrenfort, S; Kreutz, W; Scharrer, I, et al. Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in hemophiliacs. **Lancet**; 339: 594-98. 1992

Etienne-Decerf, J; Malaise, M; Mahieu, P; Winand, R. Elevated anti-alpha-galactosyl antibody titres. A marker of progression in autoimmune thyroid disorders and in endocrine ophthalmopathy?. **Acta Endocrinol.** 115(1):67-74, 1987.

Ewenstein, BM; Takemoto, C; Warrier, I; Lusher, J; Saidi, P; Eisele, J; Ettinger, LJ; DiMichele, D. Nephrotic syndrome as a complication of immune tolerance in hemophilia B. **Blood.** 89(3):1115-6, 1997.

Ewing, N. And Kasper, C. *In vitro* detection of mild inhibitors to factor VIII in haemophilia. **American Journal of Clinical Pathology;** 77:793-797, 1982.

Figueiredo, MS; Kerbauy, J; Gonçalves, MS; Arruda, VR; Saad, ST; Sonatmi, MF; Stoming, T; Costa, FF. Effect of alpha-thalassemia and beta-globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. **Am J Hematol.** 53(2):72-6, 1996.

Gitschier, J; Wood, WI; Goralka, TM; *et al.* Characterization of the human factor VIII gene. **Nature;** 312:326-30, 1984.

Goudemand, J; Rothschild, C; Demiguel, V; Vinciguerra, C; Lambert, T; Chambost, H; Borel-Derlon, A; Claeysens, S; Laurian, Y; Calvez, T. Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. **Blood.** 107:46-51, 2006.

Grisoni, ML; Proust, C; Alanne, M; Desuremain, M; Salomaa, V; Kuulasmaa, K, *et al.* Lack of association between polymorphisms of the IL18R1 and IL18RAP genes and cardiovascular risk: the MORGAM Project. **BMC Med Genet.** 27;10:44, 2009.

Haemophilia A Mutation Database: <http://europium.csc.mrc.ac.uk>

Haemophilia B Mutation Database: <http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html/>).

Hamilton, G; Colbert, JD; Schuettelkopf , AW; Watts, C. Cystatin F is a cathepsin C-directed protease inhibitor regulated by proteolysis. **EMBO J.** 6;27(3):499-508, 2008.

Hassoun, H; Hanada, T; Lutchman, M; Sahr, KE; Palek, J; Hanspal, M; *et al.* Complete deficiency of glycophorin A in red blood cells from mice with targeted inactivation of band 3 (AE1) gene. **Blood**, 91:2146-51, 1998.

Hay, CR. Why do inhibitors arise in patients with haemophilia A. **Br J Haematol**, 105:584-90, 1999.

Hedner, U. Recombinant Factor VIIa (Novoseven) as a hemostatic agent. **Semin. Hematol**, 38:43-47, 2001.

Higuchi, R; Fockler, C; Dollinger, C; Watson, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, 11:1026-30, 1993.

Houssiau FA, Lefebvre C, Vanden Berghe M, Lambert M, Devogelaer JP, Renaud JC. Serum interleukin 10 titers in systemic lupus erythematosus reflect disease activity. **Lupus**. 4:393-395, 1995

Hwang, SH; Kim, HC; Yoo, KY; Kim, HJ and Kim HS Profiling of differentially expressed genes in hemophilia a with inhibitor **Haemophilia Journal**, Volume 14, Issue S2:08PO12: 2008.

Joziassse, DH; Shaper, JH; Jabs, EW; Shaper, NL. Characterization of an alpha-1,3-galactosyltransferase homologue on human chromosome 12 that is organized as a processed pseudogene. **J. Biol. Chem.** 266: 6991-6998, 1991.

Kallas, A and Talpsep, T. Von Willebrand factor in factor VIII concentrates protects against neutralization by factor VIII antibodies of haemophilia A patients **Haemophilia** 7 375-80, 2001.

Katz, J. Prevalence of factor IX inhibitors among patients with hemophilia B: Results of a large-scale North American study. **Haemophilia**, 2: 28-31, 1996.

Keeley, EC; Mehrad, B; Strieter, RM. Chemokines as mediators of neovascularization. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 28(11):1928-36, 2008.

Kempton, CL; White, GC 2nd. How we treat a hemophilia A patient with a factor VIII inhibitor. **Blood**. 113(1):11-7, 2009.

Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. **Science**. 258:1798–1801, 1992.

Lakich, D.; Kazazian. HH; Antonarakis, SE; Gitschier, J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. **Nat. Genet.**; 5, 236-241,1993.

Lalani, I; Bhol, K; Ahmed, AR. Interleukin-10: Biology, Role in Inflammation and Autoimmunity. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, 79(6): 469-484, 1997.

Lindgren, A; Wadenvik, H and Tengborn, L. Characterization of inhibitors to FVIII with an ELISA in congenital and acquired haemophilia A. **Haemophilia**; 8, 644-648, 2002.

Liu, M; Shen, BW; Nakaya, S; Pratt, KP; Fujikawa, K; Davie, EW; Stoddard, BL and Arthur R. Thompson Hemophilic factor VIII C1- and C2-domain missense mutations and their modeling to the 1.5-angstrom human C2-domain crystal structure **Blood**, 96, 3, 979-7, 2000.

Liu, Q. and Sommer, SS. Subcycling-PCR for Multiplex Long-distance amplification of regions with high and low GC content: Application to the inversion Hotspot in The Factor VIII Gene. **BioTec.**, 25: 1022-1028, 1998

Liu, Y; Soto, I; Tong, Q; Chin, A; Bühring, HJ; Wu, T; Zen, K; Parkos, CA. SIRPbeta1 is expressed as a disulfide-linked homodimer in leukocytes and positively regulates neutrophil transepithelial migration. **J Biol Chem**. 28;280(43):36132-40, 2005.

Lorenzo, JI; Lopez, A; Altisent, C; Aznar, JA. Incidence of factor VIII inhibitors in severe haemophilia: the importance of patient age. **Br J Haematol.** 113:600-3, 2001.

Machiah, DK; Tran, TT; Viel, KR; Shen, M; Howard, TE. The pharmacogenetics and inhibitors risk (PIR) study: do multiple forms of wildtype (F)VIII contribute to the development of anti-FVIII antibodies in hemophilia A patients during coagulation factor replacement therapy? **Journal of Thrombosis and Haemostasis; Volume 3, Supplement 1 Abstract number: P0642: 2005.**

Margaritis, P; Arruda, VA; Aljamali, M; Camire, RM; Schlachterman, A; Hight KA. Novel therapeutic approach for hemophilia using gene delivery of an engineered secreted activated Factor VII. **J. Clin. Invest.**, 113: 1025-31, 2004.

May, RC; Caron, E; Hall, A; Machesky, LM. Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcγR or CR3. **Nat Cell Biol.** 2(4):246-8, 2000.

Meijerink, J; Mandigers, C; Locht, LV; Tönnissen, E; Goodsaid, F; Raemaekers, J. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. **J Mol Diag.** 3(2): 55-61, 2001.

Murador, P and Deffune, E. Structural aspects of the erythrocyte membrane. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 29(2), 2007.

National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq>

Naylor, JA; Green, PM; Rizza, CR; Giannelli, F. The factor VIII gene explains all cases of haemophilia A. **Lancet.** 340: 1066–7, 1992.

Oldenburg, J; EL-Maarri, O; Schwaab, R. Inhibitor development in correlation to factor VIII genotypes. **Haemophilia**, 8: 23-9, 2002.

Pavlova A, Delev D, Lacroix-Desmazes S, Schwaab R, Mende M, Fimmers R, Astermark J, Oldenburg J. Impact of polymorphisms of the MHC class II, IL-10, TNF- α and CTLA-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 10:1538-7836, 2009.

Poole, J; Banks, J; Bruce, LJ; Ring, SM; Levene, C; Stern, H; *et al.* Glycophorin A mutation Ala65 - Pro gives rise to a novel pair of MNS alleles ENEP (MNS39) and HAG (MNS41) and altered Wrb expression: direct evidence for GPA/band 3 interaction necessary for normal Wrb expression. **Transfusion Med.**, 9:167-74, 1999.

Qadura, M; Othman, M; Waters, B; Chegeni, R; Walker, K; Labelle, A; Ozelo, M; Hough C; Lillicrap, D. Reduction of the immune response to factor VIII mediated through tolerogenic factor VIII presentation by immature dendritic cells. **J Thromb Haemost.** 6(12):2095-104, 2008.

Reding, MT; Okita, DK; Diethelm-Okita, BM; Anderson, TA; Conti-Fine, BM. Human CD4⁺ Tcell epitope repertoire on the C2 domain of coagulation factor VIII. **J Thromb Haemost.** 1: 1777-84, 2003.

Reding, MT; Lei, S; Lei, H; Green, D; Gill, J; Conti-Fine, BM. Distribution of Th1- and Th2-induced anti-factor VIII IgG subclasses in congenital and acquired hemophilia patients. **Thromb Haemost.**, 88:568-75, 2002.

Reijnen, MJ; Peerlinck, K; Maasdam, D; Bertina, RM; Reitsma, PH. Hemophilia B Leyden: substitution of thymine for guanine at position -21 results in a disruption of a hepatocyte nuclear factor 4 binding site in the factor IX promoter. **Blood.** 1;82(1):151-8, 1993.

Reitsma, PH; Bertina, RM; Ploos van Amstel, JK; Riemens, A; Briët, E. The putative factor IX gene promoter in hemophilia B Leyden. **Blood.** 72(3):1074-6, 1998.

Rezende, SM; Pinheiro, K; Caram, C; Genovez, G; Barca, D. Registry of inherited coagulopathies in Brazil: first report. **Haemophilia**.15(1):142-9, 2009.

Rizza, C.R.; Haemophilia and related inherited coagulation defects. In: Bloom, A.L.; Forbes, C.D.; Thomas, D.P.;Tuddenham E.G.D, eds. **Haemostasis and thrombosis**. 3rd. Edinburgh: Churchill Livingstone pp. 819-41, 1994.

Rodgers, G.M.; Greenberg, C.S.; Inherited coagulation disorders. In: Lee, G.R.; Foerster, j.; Lukens, J.; Paraskevas, F.; Greer, J.P.; Rodgers, G.M.; editors. **Wintrobe's Clinical Hematology**, 10rd, Baltimore: Williams & Wilkins p1682-732,1999.

Sanger, F; Nicklen, S; Coulson, AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 74:5463-7, 1997.

Scanavini, D; Legnani, C; Lunghi, B; Mingozi, F; Palareti, G; Bernardi, F. The factor VIII D1241E polymorphism is associated with decreased factor VIII activity and not with activated protein C resistance levels **Thromb Haemost.** 93: 453-6 2005.

Scharrer, I; Bray, GL; Neutzling, O. Incidence of inhibitors in haemophilia A patients – a review of recent studies of recombinant and plasma-derived factor VIII concentrates. **Haemophilia**, 5:145-154, 1999.

Schmittgen, TD; Zakrajsek, BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **J Biochem Biophys Met.** 46: 69-81, 2000.

Schroeder, HW; Walter, MAJr; Hofker, MH; Ebens, A; Willems van Dijk K; Liao, L C; Cox, DW, Milner, EC; and Perlmutter, RM. Physical linkage of a human immunoglobulin heavy chain variable region gene segment to diversity and joining region elements. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 85(21): 8196–8200, 1988.

Storry, JA. Review: modification of red blood membrane and its application in blood groups serology. **Immunology**, 16(3):3-5, 2000.

Szajner, P; Arruda, VR; Annichino-Bizzacchi, JM; Costa, F.F. The molecular basis of brazilian hemophiliacs B patients. **XXII International Congress of the World Federation of Hemophilia**. Dublin, Ireland, 23-28 Junho de 1996.

Takai, N; Ueda, T; Nasu, K; Yamashita, S; Toyofuku, M; Narahara, H. Targeting calcium/calmodulin-dependence kinase I and II as a potential anti-proliferation remedy for endometrial carcinomas. **Cancer Lett.**18;277(2):235-43, 2009.

Thompson, SR; Humphries, SE; Interleukin-18 genetics and inflammatory disease susceptibility. **Genes Immun.** 8(2):91-9, 2007.

Thrasher, AJ. WASp in immune-system organization and function. **Nat Rev Immunol.** 2(9):635-46, 2002.

Trouw, LA; Nilsson, SC; Gonçalves, I; Landberg, G; Blom, AM. C4b-binding protein binds to necrotic cells and DNA, limiting DNA release and inhibiting complement activation **J Exp Med.** 20; 201(12): 1937-48, 2008.

Vandesompele, J; De Preter, K; Pattyn, F; Poppe, B; Van Roy, N; De Paepe, A; Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.** 3(7): 1-12, 2002.

Vehar, GA; Keyt, B; Eaton, D; *et al.* Structure of human factor VIII. *Nature* 312: 337-42, **1984.**

Verbruggen, B; Novakova, I; Wessels, H; Boezeman, J; Van Den Berg, M; Mauser-Bunschoten, E. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. **Thromb Haemost.**;73:247-51, 1995.

Viel, KR; Machiah, DK; Warren, DM; Khachidze, M; Buil, A; Howard, TE. *et al.* A sequence variation scan of the coagulation factor VIII (FVIII) structural gene and associations with plasma FVIII activity levels. **Blood**, Vol. 109, No. 9, 3713-24. 2007.

Viel, KR; Ameri, A; Abshire, TC; *et al.* Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia. **N Engl J Med.**; 360:1618-27, 2009.

Yoshitake, S; Schach, BG; Foster, DC; Davie, EW; Kurachi, K. Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). **Biochemistry** 1985; 24:3736-50.

Walter, MA and Cox, DW. Analysis of genetic variation reveals human immunoglobulin VH-region gene organization. **Am J Hum Genet.** 42(3): 446–451, 1988.

Waters, B; Qadura, M; Burnett, E; Chegeni, R; Labelle, A; Thompson, P; Hough, C; Lillicrap, D. Anti-CD3 prevents factor VIII inhibitor development in hemophilia A mice by a regulatory CD4⁺CD25⁺-dependent mechanism and by shifting cytokine production to favor a Th1 response **Blood**. Vol. 113, No. 1, pp. 193-203, 2009.

White, GC 2ND; Kempton, CL; Grimsley, A; Nielsen, B; Roberts, HR. Cellular immune responses in hemophilia: why do inhibitors develop in some, but not all hemophiliacs? **J Thromb Haemost.**, 3:1676-81, 2005.

White, GC 2ND; Rosendaal, F; Aledort, LM; *et al.* Definitions in hemophilia: recommendation of the Scientific Subcommittee on Factor VIII and Factor IX of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. **Thromb Haemost.** 85:560.2001

Wight J, Paisley S. The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. **Haemophilia** 2003;9:418–35.

Zheng C, Huang D, Liu L, *et al.* Interleukin-10 gene promoter polymorphisms in the multiple myeloma. **Int J Cancer**.95:184-188, 2001.

9. Anexos

ANEXO 1

Questionário do Paciente

Nome do Centro: _____

Data do preenchimento: ____/____/____ Registro hospitalar (HC) _____

Identificação (nome completo): _____

Nome da mãe: _____

Local de Procedência: _____

DADOS DEMOGRÁFICOS

1. Data de nascimento: ____/____/____

2. Sexo: ☐ masculino ☐ feminino

3. Local de nascimento: _____

4. Raça predominante (características físicas): ☐ branco ☐ pardo ☐ negro ☐ índio ☐ oriental

5. Raças ou etnias presentes
(selecione quantas alternativas forem necessárias)

- ☐ Branco (ou ascendência européia)
☐ Negro (ou ascendência africana)
☐ Asiático/Ilhas do Pacífico
☐ Índio / América do Sul (completar abaixo
Se souber)(tribo: _____)
☐ Índio / América Central
(tribo: _____)

6. Etnia ou ascendência (p.ex., italiano, cubano): _____

7. Tipo de hemofilia ☐ Hemofilia A (deficiência de fator VIII)
☐ Hemofilia B (deficiência de fator IX)

8. Gravidade da hemofilia ☐ Leve (>5%) FVIII:C ou FIX:C: _____ %
☐ Moderada (1-5%) FVIII:C ou FIX:C: _____ %
☐ Grave (<1%) FVIII:C ou FIX:C: _____ %

9. Qual a média de consumo de hemoderivados nos últimos anos? ☐ ☐ mínimo 1 vez por semana
☐ 2-3 vezes por mês
☐ uma vez por mês ou menos
☐ 4-6 vezes por ano
☐ 2 vezes ao ano ou menos

10. Qual sua idade a primeira vez que recebeu:
plasma ou crio: _____ concentrado de fator: _____

11. Este questionário está sendo preenchido na mesma data da coleta das amostras?
☐ Não ☐ Sim Quando aproximadamente recebeu oncentrado de fator pela última vez? _____

12. Têm mutação conhecida? ☐ Não ☐ inversão íntron 22 ☐ inversão íntron 1 ☐ outro.
Qual? _____

13. Durante a infância, foi amamentado (aleitamento materno)?
☐ Não ☐ SIM (por quanto tempo? _____) ☐ Não sabe

INIBIDOR

14. Inibidor (anticorpo FVIII ou FIX) já foi detectado no plasma deste paciente? Sim
- ☐ Não → **VÁ PARA 15**
- ☐ Desconhecido → **VÁ PARA 15**
- 14a. Primeira vez que foi detectado inibidor: _____ Unidades Bethesda (____/____/____)
- 14b. Qual foi o maior título de inibidor? _____ Unidades Bethesda (____/____/____)
- 14c. Último título de inibidor: _____ Unidades Bethesda (____/____/____)
- 14d. No momento em que foi detectado inibidor pela primeira vez o paciente
(selecione mais que um se necessário):
- ☐ ☐ Havia sido submetido à cirurgia/procedimento, com uso de concentrado de fator em grandes doses
- ☐ Após infusão contínua
- ☐ Estava em vigência de quadro infeccioso
- ☐ Durante uso de produto específico. Qual? _____
- ☐ Outra situação especifique: _____
- ☐ Nenhuma alternativa se aplica
15. O paciente possui um irmão ou outro parente com hemofilia? ☐
- ☐ Não ☐ Desconhecido
- ☐ Sim (assinale abaixo, todas as opções necessárias)
- ☐ irmãos Quantos? _____ Identificação (se incluído) _____
- ☐ tios materno Quantos? _____ Identificação _____
- ☐ primos 1º Quantos? _____ Identificação _____
- ☐ primos 2º Quantos? _____ Identificação _____
- ☐ outros Quantos? _____ Identificação _____
- Se possível fazer heredograma

PERFIL SOROLÓGICO

16. Assinale as opções de acordo com o histórico sorológico e evolução da infecção:

SE AFIRMATIVO:

	<u>Negativo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Desconhecido</u>	<u>Em tratamento / doença</u>	
		<u>ativa:</u>			
a. Hepatite C	☐	☐	☐	☐ sim	☐ não
b. HIV	☐	☐	☐	☐ sim	☐ não
c. Hepatite B	☐	☐	☐	☐ sim	☐ não
(P: positivo/N: negativo) atualmente: HBsAg () anti HBc () anti HBs()					

Observações:

ANEXO 2



Centro de Hematologia e Hemoterapia

UNICAMP



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE.....
REGISTRO HOSPITALAR -HC : DATA NASCIMENTO:...../...../.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO: BAIRRO:
CIDADE: CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : "**Caracterização de aspectos genéticos e imunológicos envolvidos no desenvolvimento de inibidores em Hemofilia A e B**".

PESQUISADORES:

Andrey dos Santos Aluno de Doutorado Departamento Clínica Médica
Margareth Castro Ozelo CRM: 77434 CARGO/FUNÇÃO: Médica Assistente, Orientadora
UNIDADE DA FCM - UNICAMP: Serviço de Hematologia e Hemoterapia – HEMOCENTRO UNICAMP
AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA: RISCO MÍNIMO

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

- 1. justificativa e os objetivos da pesquisa:** os médicos do Hemocentro da UNICAMP que acompanham pacientes portadores de doenças associadas a sangramentos, tais como hemofilia e doença de von Willebrand, estão fazendo uma pesquisa chamada: "**Caracterização de aspectos genéticos e imunológicos envolvidos no desenvolvimento de inibidores em Hemofilia A e B**". Hemofilias são doenças hemorrágicas resultantes da deficiência do fator VIII (hemofilia A) ou fator IX (hemofilia B) da coagulação. As hemofilias A e B, de caráter genético, ocorrem devido a alterações na parte do DNA que é responsável pela produção de fator VIII ou IX, respectivamente. Na maioria das vezes, tanto na hemofilia A quanto na hemofilia B, a alteração genética é transmitida da mãe (portadora) para o filho ou do pai com hemofilia para filha que será portadora. Existem inúmeras alterações no material genético dos indivíduos que podem estar associadas tanto com a hemofilia A quanto com a hemofilia B e de acordo com o tipo de alteração os sintomas podem ser mais ou menos graves.
- 2. procedimentos que serão utilizados e propósitos,** incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: se você/seu filho (a) concordar em participar deste estudo, após a assinatura deste documento, o Termo de Consentimento, serão coletadas amostras de sangue (em torno de 10 ml de sangue no total) que serão utilizadas para: obter o DNA que será utilizado para pesquisar a presença ou não da mutação (alteração) relacionada a Hemofilia. Esta mesma alteração poderá ser pesquisada em outros membros da sua família, desde que seja do desejo destas pessoas saber se também apresentam risco de ter a doença ou de terem filhos que possam apresentar a doença. Neste caso, será solicitadas amostras de sangue (em torno de 10 ml de sangue no total) também para estes outros membros da família. Nenhuma alteração ou interferência em seu tratamento será feita em decorrência de sua participação nesse estudo. Um questionário, com perguntas sobre você, o diagnóstico e evolução da sua doença, assim como, alguns dados de sua família, será feito por seu médico, para que se possa entender melhor os resultados que esperamos encontrar. Você terá assegurado o direito de livre acesso aos resultados dos exames realizados nesse estudo. Gostaríamos de solicitar ainda sua autorização para mantermos armazenado uma amostra de seu material genético (DNA) em nosso laboratório. Caso haja a possibilidade de utilizarmos esta amostra em projetos de pesquisa futuros, mediante aprovação dos comitês de ética, você será anteriormente informado e

novamente solicitaremos sua autorização para que a pesquisa possa ser feita utilizando seu material genético.

3. desconfortos e riscos esperados: durante a coleta de sangue você pode sentir dor. Pode ficar uma mancha roxa no local da coleta.
4. acesso aos resultados: os resultados de seus exames e dos exames de seus familiares, realizados durante esta pesquisa serão repassados a você e a seus familiares por um médico, ou profissional habilitado. Ele dará todas as explicações sobre sua alteração genética e ainda vai orientá-lo(a) quanto as possibilidades de outras pessoas de sua família apresentarem o mesmo problema. Você e/ou seus familiares também têm o direito de não ser informado do resultado, caso seja essa a escolha.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas. Se você tiver qualquer dúvida ou pergunta sobre este estudo, você pode entrar em contato com o Hemocentro para esclarecimento.
 2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. Se você concordar em participar no estudo "Caracterização de aspectos genéticos e imunológicos envolvidos no desenvolvimento de inibidores em Hemofilia A e B", você poderá mudar de idéia e se retirar do estudo a qualquer momento. Se você não quiser participar, você continuará a ser tratado normalmente aqui no Hemocentro da UNICAMP.
 3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade. Será mantido sigilo dentro dos limites da lei. Os arquivos de pesquisa do estudo serão identificados por um código numérico e este código vai ficar em lugar seguro, com acesso restrito aos médicos do Hemocentro da UNICAMP.
 4. disponibilidade de assistência no Hemocentro da UNICAMP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa. Caso aconteça algum problema durante a coleta, você terá atendimento gratuito da equipe do Hemocentro da UNICAMP.
-

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO.

Em caso de qualquer intercorrência, entrar em contato com o Hemocentro da UNICAMP (Dra Margareth Castro Ozelo; Dr Erich Vinícius de Paula; ou com o biólogo Andrey dos Santos) pelos telefones 19. 3251-8715; 19. 3251. 8755. Nos finais de semana, feriados e no período das 19h às 8h, ligar para 19. 3251-7246 no serviço de Transfusão do HC-UNICAMP.
Comitê de Ética em Pesquisa – FCM Tel.: 3788.8936

VI - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa, intitulado: "Caracterização de aspectos genéticos e imunológicos envolvidos no desenvolvimento de inibidores em Hemofilia A e B".

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Data

assinatura de uma testemunha

Data

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Data

VII - CONSENTIMENTO PARA ARMAZENAMENTO DE DNA / RNA

Obs: Caso além de participar da pesquisa você concorde em manter seu DNA (de seu filho (a)) armazenado em nosso Laboratório de Biologia Molecular em Hemostasia do Hemocentro da Unicamp, assine seu nome diante da opção "SIM, aceito que meu DNA seja armazenado". Neste caso, você deve estar ciente que esta amostra só poderá ser utilizada após sua autorização. Caso não concorde, assine seu nome diante da opção "Não, não aceito que meu DNA seja armazenado".

[] SIM, eu aceito que meu DNA / RNA seja armazenado

[] NÃO, não aceito que meu DNA / RNA seja armazenado

_____, ____ de _____ de _____.
local dia mês ano

Anexo 3

3.1. Artigos publicados

Santos A, Annichino-Bizzacchi JM, Ozelo MC. Inhibitors of Factor VIII in Hemophilia Source: NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE Volume: 361 Issue: 3 Pages: 309-310, 2009.

3.2. Apresentação em Congressos

Santos A, Damian G, Siqueira LH, de Paula EV, Annichino-Bizzacchi JM, Ozelo MC. Allelic variants of human factor VIII in brazilian patients with severe hemophilia A and correlation with the risk of inhibitor. *J Thromb Haemost*; Volume 7, Supplement 2: Abstract PP-MO-520, 2009.

Santos A, Montalvão SAL, Siqueira LH, Damian GB, Thomas S, Veiga M, Fujimoto DE, Strega A, de Paula EV, Anicchino-Bizzacchi JM, Ozelo MC. Lower incidence of IgGs subclasses of anti-FVIII antibodies that recognize an intermediate-purity plasma derived factor VIII product in severe hemophilia A inhibitor positive patients. *J Thromb Haemost* Volume 7, Supplement 2: Abstract PP-MO-521, 2009.

Santos A, Montalvão SAL, Furlan Freguia C, de Paula EV, Annichino-Bizzacchi JM, Camire RM, Ozelo MC. Molecular and biochemical characterization of FVIII

mutations in a female with severe hemophilia A, 11/2007, *Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia – HEMO 2007*, Vol. 29, pp.89-89, São Paulo, SP, Brasil, 2007.

Santos A, Montalvão SAL, Furlan Freguia C, de Paula EV, Annichino-Bizzacchi JM, Camire RM, Ozelo MC. Molecular and biochemical characterization of FVIII mutations in a female with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost*; 5 Supplement 2: P-T-123, 2007.

Santos A, Montalva O, Thomas S, Veiga M, De Paula E, Ozelo M. Genetic and ethnic aspects related to the development of inhibitors among Brazilian patients with hemophilia from five distinct geographical regions in Brazil. *Haemophilia*; 12: 1-154, 2006.

Anexo 4



CEP, 20/07/04.
(Grupo I)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP
☎ (0_19) 3788-8936
FAX (0_19) 3788-8925
🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html
✉ cep@fcm.unicamp.br

PARECER PROJETO: N° 279/2004

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "ESTUDO MULTICÊNTRICO BRASILEIRO DE INIBIDORES EM HEMOFILIA – CARACTERIZAÇÃO DE ASPECTOS GENÉTICOS E IMUNOLÓGICOS ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DE INIBIDORES EM HEMOFILIA A E B"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Margareth Castro Ozelo

INSTITUIÇÃO: Centro de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Estadual de Campinas - HEMOCAMP - UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 07/06/2004

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 15/12/04 e 15/06/05

II - OBJETIVOS

Determinar, entre os indivíduos com diagnóstico de hemofilias A e B, os fatores genéticos e não genéticos envolvidos no desenvolvimento ou proteção ao desenvolvimento de anticorpos neutralizadores (inibidores) dos fatores de coagulação, caracterizando (a) a prevalência de inibidores contra FVIII ou FIX com antecedentes étnicos distintos, pertencentes às cinco regiões brasileiras, (b) classificar os anticorpos conforme a subclasse de imunoglobulina a que pertencem e (c) pesquisar a presença de inibidores em irmãos ou outros parentes próximos não hemofílicos.

III - SUMÁRIO

Trata-se de um estudo prospectivo, multicêntrico nacional envolvendo dados epidemiológicos e de marcadores genéticos (mutações e polimorfismos gênicos). Serão envolvidos de 500 a 800 indivíduos com diagnóstico de hemofilias A ou B das cinco regiões brasileiras que serão submetidos a: (1) dados de identificação, com ênfase na ascendência étnica, (2) confecção de heredograma, (3) coleta de sangue para confirmação e classificação do tipo de hemofilia, bem como para pesquisa da presença e classificação dos inibidores (anticorpos neutralizadores) contra FVIII e FIX, além de extração de DNA genômico e RNA.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto está bem estruturado e a pesquisadora é altamente qualificada, tendo recebido um prêmio internacional da "Bayer Hemophilia Awards Program" que será utilizado para custear esta pesquisa. O termo de consentimento livre e esclarecido pós-informação é bastante detalhado e usa uma linguagem clara (porém não de todo simples para a maioria da população brasileira) descrevendo os objetivos, procedimentos, desconfortos e riscos esperados, além de garantir acesso às informações geradas, liberdade de descontinuidade no projeto, salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade, bem como assistência médica em caso de eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa. Não haverá envio de material biológico para o exterior.

Consideramos o projeto de relevância, metodologicamente bem fundamentado e com descrição dos aspectos éticos adequada.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

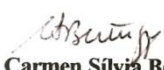
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 20 de julho de 2004.


Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP