

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

**CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM HEMOFÍLICOS A  
GRAVES DO RIO GRANDE DO SUL**

**ROBERTA PETRY GORZIZA**

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

**Orientador: Francisco M. Salzano**

**Co-orientadora: Eliane Bandinelli**

Porto Alegre, Março de 2012.

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

## **AGRADECIMENTOS**

*Ao Professor Salzano, pela confiança, pelos ensinamentos e pelo exemplo de dedicação ao conhecimento e à pesquisa.*

*À Professora Eliane Bandinelli, pela amizade, pela dedicação e paciência e pelos ensinamentos, os quais contribuíram muito para minha carreira.*

*Ao Igor, à Djenifer e à Clévia, pela amizade e por toda a ajuda e a participação na realização desse projeto.*

*Aos colegas de laboratório, Mariana, Carla, Ana Maria, Ana Paula e Patrícia, pela amizade e pelo convívio sempre agradável no laboratório.*

*À Luciana Tovo Rodrigues, pelas “aulas” de sequenciamento.*

*Ao grupo de Bioinformática do Laboratório de Imunogenética da UFRGS, em especial à Meg e ao Gustavo, por todo o auxílio em bioinformática.*

*À minha mãe, Suzana, por todo o amor, o incentivo, o exemplo e o esforço incondicional em me ajudar.*

*Ao meu noivo, Endel, pelo amor e carinho, pela paciência, pelo apoio em todos os momentos e por tornar cada um dos meus dias mais feliz com a sua presença.  
Te amo muito!*

*À Andresa e ao César, pela amizade, companhia e incentivo.*

*À minha segunda família, Sônia, Egon, Edgard e Sâmia, por todo o carinho e companheirismo.*

*Aos meus amigos, Priscilla e Rodrigo, Jaqueline e Fábio, Renan, Henrique, Bianca A., Bianca P., Renato, Werner, Taianny e Verônica, pelos conselhos, pelo auxílio, pela paciência e por todas as alegrias que sempre trouxeram.*

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

*Ao Elmo, por toda a ajuda sempre que necessária.*

*Aos pacientes que participaram desse estudo, bem como os HEMOCENTROS envolvidos.*

*A todas as pessoas que estiveram presentes em minha vida nesses anos de estudo,  
o meu muito obrigada!*

## SUMÁRIO

RESUMO .....	9
ABSTRACT.....	11
1. Hemostasia .....	12
1.1. A Via Clássica da Coagulação.....	13
1.2. O Modelo Celular da Coagulação.....	14
2. As Hemofilias .....	16
2.1. A Hemofilia A .....	17
2.1.1. Classificação, Sintomatologia e Diagnóstico da Hemofilia A .....	17
2.1.2. O Tratamento da Hemofilia A .....	18
2.1.3. Complicações do Tratamento: A Formação de Inibidores anti-FVIII .....	19
3. O Fator VIII (FVIII).....	20
3.1. O Gene e a Estrutura do FVIII .....	20
3.2. Mutações no Gene do FVIII e a Hemofilia A.....	25
3.2.1. Correlações Genótipo-Fenótipo: O Tipo de Mutação e o Desenvolvimento de Inibidores Anti-FVIII .....	30
3.2.2. Análise Estrutural para o Melhor Entendimento da Relação Estrutura-Função .....	31
CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS.....	33
CAPÍTULO 3 – ARTIGO .....	34
CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO GERAL.....	51
Referências Bibliográficas .....	55

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

FII: Fator II da coagulação

FV: Fator V da coagulação

FVII: Fator VII da coagulação

FVIII: Fator VIII da coagulação

FVIIIa: Fator VIII da coagulação ativado

FIX: Fator IX da coagulação

FX: Fator X da coagulação

FXI: Fator XI da coagulação

FXII: Fator XII da coagulação

FT: fator tissular

FvW: Fator de Von Willebrand

HA: Hemofilia do tipo A

IRFT: inibidor da rota do fator tissular

LDL: lipoproteína de baixa densidade

TP: tempo de protrombina

TTPA: tempo de tromboplastina parcial ativada

TT: tempo de trombina

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> As vias clássicas da coagulação sanguínea.....	14
<b>Figura 2:</b> O modelo celular da coagulação. ....	16
<b>Figura 3:</b> Domínios do FVIII.....	21
<b>Figura 4:</b> Ativação do FVIII.. ....	22
<b>Figura 5:</b> A estrutura tridimensional do FVIII.....	23
<b>Figura 6:</b> O FVIIIa e o FIXa – Complexo Xase.....	25

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Distribuição das mutações já descritas em hemofílicos A graves nos 26 éxons do FVIII. ....	27
<b>Tabela 2.</b> Estudos de mutações em hemofílicos A em diferentes populações no mundo. ....	29
<b>Tabela 3.</b> Distribuição dos altos títulos de inibidores, em relação ao tipo de mutação .....	30
<b>Tabela 4.</b> Tipo de mutação no gene do FVIII e o desenvolvimento de inibidores ....	31
<b>Tabela 5.</b> Mutações recentemente estudadas por bioinformática.....	32



## RESUMO

A hemofilia A (HA) é uma doença hemorrágica hereditária ligada ao cromossomo X, causada pela atividade reduzida ou ausente do fator VIII da coagulação (FVIII). Essa doença é o resultado de mutações heterogêneas no gene do FVIII. A identificação das mutações patogênicas é importante para o aconselhamento genético e para a avaliação das manifestações clínicas. Embora mais de 700 mutações no gene já tenham sido descritas como responsáveis pela HA grave (nível de FVIII <1%), não existem dados a respeito na população do Rio Grande do Sul. O objetivo desse trabalho é a identificação das alterações genéticas em 48 pacientes hemofílicos graves, de diferentes famílias, com resultado negativo para a presença das inversões nos íntrons 22 e 1. Tais inversões são as mutações mais comumente encontradas (40-50% e 5%, respectivamente) em hemofílicos A graves. Todos os pacientes foram analisados para a presença de grandes deleções por PCR *multiplex*, utilizando-se 35 pares de *primers* que abrangem os 26 éxons e as regiões 5' e 3'UTR do gene. Os pacientes que não apresentaram grandes deleções foram analisados por sequenciamento direto dos exons. As variações nas sequências foram verificadas com os softwares Codon Code Aligner e MEGA5.04, para realizar alinhamentos múltiplos e para analisar a tradução da proteína mutada. O *software* PolyPhen-2 foi utilizado para verificar se as mutações alterariam a estrutura e a função da proteína; o *software* SDM foi utilizado para verificar se as mutações alterariam a estabilidade da proteína. Uma figura com a localização das mutações no gene do FVIII foi desenhada com o programa Pymol. Foram encontradas em 70% dos pacientes: uma grande deleção (incluindo os éxons 4, 5 e 6), nove pequenas deleções, cinco pequenas inserções, oito mutações de sentido trocado e seis mutações sem sentido, das quais treze são recorrentes e dezesseis são novas mutações, não descritas no banco de dados *online* HAMSTeRS. Quarenta e quatro por cento dos indivíduos com mutação encontrada desenvolveram inibidores, sugerindo um maior risco de desenvolvimento de inibidores em pacientes com grandes deleções, mutações sem sentido e pequenas deleções/inserções, quando comparado com pacientes com mutações de troca de sentido. Entre outras mutações de efeito evidente, foram encontradas duas mutações (D542G e S109P)

que podem interferir em sítios de ligação ao cálcio, uma mutação (P2205R) que pode ser prejudicial à interação entre o FVIII e o fator de von Willebrand (FvW) e uma mutação (L2297R), que altera a superfície eletrostática da proteína. Esses dados contribuem para o melhor entendimento da funcionalidade e da estrutura do FVIII.

## ABSTRACT

Hemophilia A (HA) is an X-linked inherited bleeding disorder caused by reduced or absent clotting factor VIII (FVIII) activity, determined by heterogeneous mutations in the FVIII gene. Identification of these pathogenic mutations is important for genetic counseling and the assessment of clinical manifestations. Although more than 700 mutations of the FVIII gene have been reported as responsible for severe hemophilia (FVIII: C<1%), the corresponding data is currently insufficient for Southern Brazilian populations. The aim of this study was to identify genetic changes in 48 unrelated severe HA patients, who showed negative results for inversions in introns 22 and 1. These inversions are the most common mutations (40-50% and 5%, respectively) in severe HA patients. All patients were screened for gross deletions by multiplex PCR, with 35 pairs of primers for the 26 exons and 5'- and 3'- UTR of the gene. Those without any gross deletion were then analyzed by direct sequencing for all exons. Sequence variation was analyzed with the Codon Code Aligner and the Mega0.4 softwares for multiple alignments and protein translation. PolyPhen-2 was used to predict if the mutations would alter protein's structure and function; SDM was used to verify if the mutations would alter the protein stability. One image with the location of FVIII mutations was drawn with the Pymol software. In 70% of the patients one gross deletion (including exons 4, 5 and 6), nine small deletions, five small insertions, eight missense and six nonsense mutations were found, of which thirteen were recurrent and sixteen were novel, never reported in the HAMSTeRS database. Forty-four per cent of these mutation carriers developed FVIII inhibitors, suggesting a higher risk of inhibitors development in patients with large deletions, small deletions/insertions, and nonsense mutations than in patients with missense mutations. Among mutations of clear effect, two mutations (D542G and S109P) that may interfere with calcium binding, a mutation that may affect FVIII and von Willebrand factor (FvW) interaction (P2205R), and L2297R, that clearly affects the molecule's electrostatic surface were found. The results enable us to better understand structural and functional aspects of this protein.

### 1. Hemostasia

A hemostasia é um processo complexo e dinâmico, que compreende os mecanismos fisiológicos que mantêm a estabilidade do sistema circulatório, envolvendo a manutenção da fluidez sanguínea, e o processo de coagulação, quando a interrupção de uma hemorragia se faz necessária. Se o processo de coagulação é deficitário, o indivíduo pode sofrer uma hemorragia mesmo frente a uma lesão menor. Se, pelo contrário, o mecanismo de formação do coágulo atua em excesso, podem originar-se trombos dentro do sistema vascular, obstruindo o fluxo sanguíneo (Molinas & Bozzini, 2004).

Após um dano vascular, as plaquetas se aderem ao colágeno, o qual envia sinais que induzem o aumento de cálcio. O Fator de von Willebrand (FvW) forma uma ponte entre as fibras de colágeno e uma glicoproteína específica na superfície das plaquetas (GPIb). As plaquetas aderentes tornam-se mais esféricas e emitem pseudópodos, forçando a liberação de grânulos citoplasmáticos com ADP, tromboxano e serotonina, os quais atraem outras plaquetas para o local de lesão (Marcus & Safier, 1993; Koeppen & Stanton, 1996). Consecutivamente, o fibrinogênio se liga à integrina GPIIb/IIIa das plaquetas, resultando em agregação plaquetária. Esse processo auto-amplificador é controlado por sinais de células endoteliais, para restringir o tampão plaquetário no local de dano vascular (Stassen *et al.*, 2004). Em pequenos vasos, as plaquetas são capazes de interromper um sangramento. Sangramentos extensos, todavia, necessitam da hemostasia secundária (coagulação). O efeito principal do processo de coagulação é que uma proteína solúvel no plasma, o fibrinogênio, é convertida em fibrina por meio da ação da trombina, gerada pela cascata de coagulação (Marcus & Safier, 1993).

A coagulação sanguínea engloba a iniciação e formação do tampão plaquetário, a propagação da cascata de coagulação, o término do processo por

mecanismos de controle antitrombótico e a remoção do coágulo por fibrinólise (Moran & Viele, 2005).

### 1.1. A Via Clássica da Coagulação

Em 1964, Davie & Ratnoff propuseram a cascata de coagulação clássica, na qual a ativação inicial provoca uma reação em cadeia que é amplificada logaritmicamente. Tradicionalmente, a cascata de coagulação foi dividida em duas vias: a intrínseca e a extrínseca.

A via intrínseca é ativada por superfícies negativamente carregadas. Três proteínas plasmáticas estão envolvidas na iniciação dessa via: fator XII (FXII), pré-caliceína e cininogênio de alto peso molecular. O FXII ativado, juntamente com o cininogênio de alto peso molecular, ativa o fator IX (FIX). O FIX ativado, em complexo com o fator VIII (FVIII) ativado, forma o complexo Xase intrínseco, o qual leva à ativação do fator X (FX). O FX ativado transforma a protrombina em trombina. O FVIII é ativado tanto por FX como por trombina, aumentando, conseqüentemente, a formação de FX e trombina. A trombina também aumenta a produção de FIX, através da ativação de fator XI (FXI) (Tuddenham & Cooper, 1994; Schenone *et al.*, 2004).

A via extrínseca ocorre quando um vaso sanguíneo é danificado, expondo o fator tissular (FT). O FT é necessário para a ativação de fator VII (FVII) e, juntos, o FT e o FVII ativado ativam os fatores X e IX. O FIX ativado também ativa o FX (complexo X-ase intrínseco) (Tuddenham & Cooper, 1994; Schenone *et al.*, 2004).

A partir dessas vias propostas para explicar os mecanismos de coagulação, foram desenvolvidos os testes *in vitro* Tempo de Protrombina, Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada e dosagens de fatores de coagulação, utilizados na triagem e detecção de deficiências de fatores de coagulação.

Atualmente, é aceito que esses mecanismos não atuam independentemente, mas interagem de modo complementar (Bolton-Maggs & Pasi, 2003). A Figura 1 representa um esquema simplificado dos processos envolvidos na conversão da trombina, segundo o modelo atual.

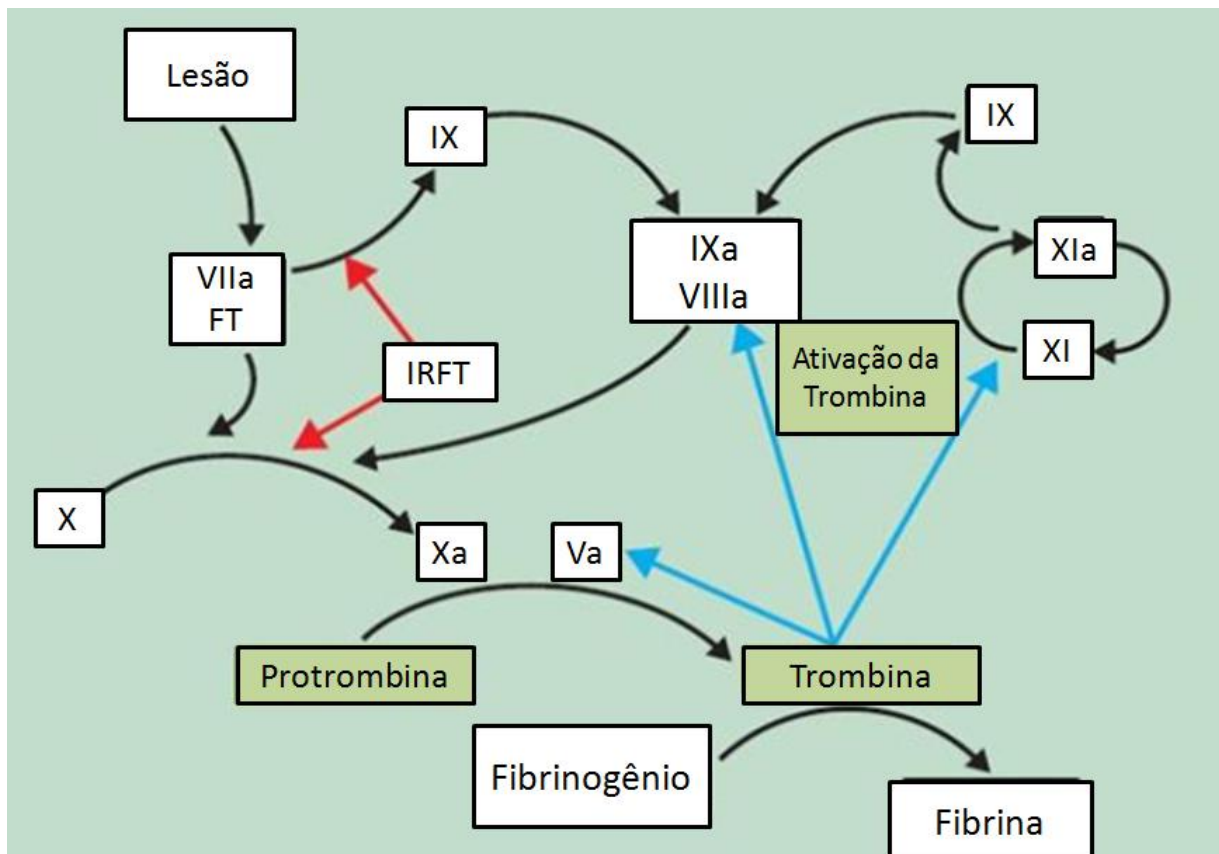


Figura 1: As vias clássicas da coagulação sanguínea. A coagulação é iniciada quando uma lesão tecidual expõe o fator tissular (FT). O fator VII liga-se ao FT e então ativa os fatores X e IX a fator Xa, e IXa. Na presença de fator Xa, o inibidor da rota de fator tissular (IRFT) evita a produção de fatores Xa e IXa. Após essa inibição, a quantidade de fator Xa é insuficiente para manter a coagulação. A produção futura de fator Xa, que permite a continuidade da hemostasia, pode ser ativada apenas pelo caminho dos fatores IX/VIII. A trombina, nesse momento, já foi produzida em quantidade suficiente para ativar o fator VIII e, juntamente com o fator IX (produzido pelos FT e FVIIa), pode ocorrer a ativação do fator X. O aumento de fator IX ocorre via ativação da trombina, pela rota do fator XI (Adaptado de Bolton-Maggs & Pasi, 2003).

## 1.2. O Modelo Celular da Coagulação

Em 2001, Hoffmann & Monroe propuseram um novo modelo baseado em células, enfatizando a interação dos fatores de coagulação em superfícies celulares específicas. Esse modelo baseia-se em três etapas (iniciação, amplificação e propagação) que ocorrem em diferentes tipos celulares.

A iniciação começa nas células que contêm FT. Se o estímulo pró-coagulante é suficientemente forte, são formados fatores Xa, IXa e trombina suficientes para iniciar o processo de coagulação. A amplificação da resposta coagulante ocorre quando a ação passa da célula com FT para a superfície plaquetária. O estímulo pró-coagulante é amplificado enquanto as plaquetas aderem, são ativadas e acumulam cofatores ativados em sua superfície. Finalmente, na fase de propagação, as proteases ativas combinam com seus cofatores na superfície plaquetária, no local adaptado para gerar grandes quantidades de trombina. A atividade dos complexos pró-coagulantes produz uma quantidade máxima de trombina, que resulta na polimerização de fibrina (Hoffman & Monroe, 2001; Hoffman, 2003; Becker, 2005). A Figura 2 ilustra o modelo celular da coagulação.

O FT é o iniciador fisiológico primário da coagulação; ele permanece localizado na membrana da célula à qual foi sintetizado. Com o dano vascular, o FVII se liga fortemente ao FT e é rapidamente ativado por proteases. O complexo FVIIa/FT ativa os fatores X e IX. O FXa pode ativar o fator V (FV). O FXa é rapidamente inativado por inibidor da rota de fator tissular (IRFT) se ele se afasta do ambiente protegido da superfície das células. Entretanto, o FXa que permanece na superfície, juntamente com o FVa, pode produzir pequenas quantidades de trombina. As plaquetas se aderem aos componentes da matriz extracelular no local do dano, e a pequena quantidade de trombina aumenta a aderência plaquetária, bem como a sua ativação e promove a ativação dos fatores V, VIII e XI. Ainda, a trombina age na superfície plaquetária como a determinadora da ligação do complexo pró-coagulante. O FvW/FVIII liga-se às plaquetas e é clivado pela trombina para ativar o FVIII e o liberar do FvW. O FVIII permanece na superfície plaquetária. Uma vez que as plaquetas estão ativadas, com os cofatores V e VIII ativados em sua superfície, ocorre a ligação dos complexos pró-coagulantes e começa a produção de trombina em larga escala. As plaquetas expressam sítios de alta afinidade de ligação por FIX, FXa e FXI. Forma-se o complexo Xase (FIX/FVIII) na superfície plaquetária. O FXI pode fornecer mais FIXa diretamente na superfície das plaquetas. O complexo Xase ativa mais FX, enquanto que o FXa, junto com o FVa, pode produzir a quantidade de trombina necessária para formar um coágulo de fibrina (Hoffman & Monroe, 2001).

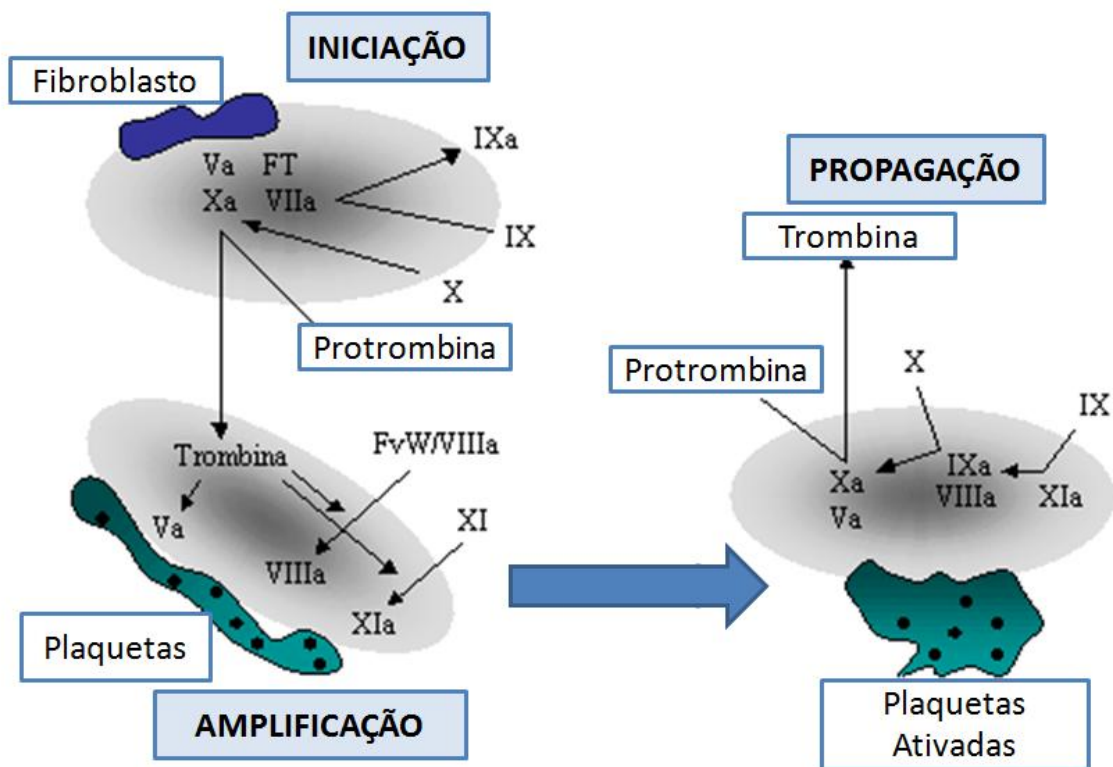


Figura 2: O modelo celular da coagulação. Neste esquema estrutural-funcional, a coagulação ocorre em três fases: iniciação, amplificação e propagação (Adaptado de Hoffman & Monroe, 2001).

## 2. As Hemofilias

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



## **2.1. A Hemofilia A**

A hemofilia A (HA) é uma doença hemorrágica causada pela redução ou ausência da atividade do fator VIII da coagulação (FVIII), devido a mutações no gene que codifica a proteína. O padrão de herança é recessivo ligado ao sexo; na maioria dos casos, a hemofilia é transmitida ao filho pela mãe heterozigota, que é geralmente assintomática. Porém, cerca de 30% dos casos de hemofilia decorrem de mutação nova, isto é, ocorre na ausência de casos em outros membros familiares (Kasper & Lin, 2007).

A prevalência de nascimentos de crianças com a doença no mundo é de aproximadamente um em cada 5.000 indivíduos masculinos (Hoyer, 1994; Soares *et al.*, 2001), e esses dados são válidos para todas as origens étnicas (Bolton-Maggs & Pasi, 2003). No Rio Grande do Sul, a prevalência estimada foi de 1:11.700 homens (Alexandre & Roisenberg, 1985).

De acordo com o Registro Nacional de Coagulopatias, em 2007 o Brasil já tinha 8.169 pacientes cadastrados como hemofílicos; destes, 84,2% apresentavam HA. Quanto à gravidade da doença, 28,1% desses hemofílicos A apresentam a forma grave (Rezende *et al.*, 2009).

### **2.1.1. Classificação, Sintomatologia e Diagnóstico da Hemofilia A**

Os pacientes hemofílicos A podem ser classificados em três grupos (graves, moderados e leves) de acordo com as características clínicas apresentadas e a quantidade de fator VIII produzida. Segundo a Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia (ISTH), são considerados casos graves aqueles em que a atividade do fator VIII (FVIII: C) é <1%, moderados quando apresentam atividade entre 1 e 5% e leves, quando a atividade do fator VIII está entre 5 e 40% (White *et al.*, 2001). O Ministério da Saúde do Brasil segue essa classificação (Veiga *et al.*, 2008).

Os hemofílicos graves apresentam sangramentos espontâneos ou após traumas leves, os moderados apresentam sangramentos importantes após pequenos

traumas, e os que apresentam a forma leve apenas manifestam a doença após traumatismos fortes ou em intervenções cirúrgicas (Tuddenham & Copper, 1994). Cerca de 50% dos indivíduos afetados são hemofílicos graves, enquanto os moderados e leves ocorrem nas frequências de 30% e 20%, respectivamente (Antonarakis *et al.*, 1995).

As hemorragias podem ocorrer sob as formas de hematúria, epistaxe, melena/hematêmese ou ainda apresentarem-se como hematomas e hemartroses, sendo esses os aspectos mais característicos da forma grave da doença (Gilbert, 1981; Veiga *et al.*, 2008).

Nos exames laboratoriais realizados para a triagem da cascata de coagulação, o hemofílico A apresenta o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) aumentado, associado com níveis de FVIII reduzidos e níveis normais de FwW. O Tempo de Protrombina (TP) e o Tempo de Trombina (TT) encontram-se normais.

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

O tratamento da Hemofilia A baseia-se na infusão de FVIII, podendo este ser purificado de plasma humano, por técnicas clássicas, ou obtido por DNA recombinante (Rezende *et al.*, 2009). Porém, existe uma dificuldade na manutenção de níveis adequados de FVIII no plasma, para proteger contra hemorragias, pois sua meia-vida é baixa (10-12h) e é necessária a administração do FVIII a cada 2-3 dias (Oldenburg *et al.*, 2009). Outra dificuldade do tratamento é o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes, chamados inibidores, contra o fator de coagulação administrado (Rieger, 1996; Rezende *et al.*, 2009).

Terapias alternativas para sangramentos agudos em pacientes com inibidor incluem altas doses de FVIII humano e remoção do anticorpo por imunoadsorção ou plasmaferese, seguido de infusão de FVIII (Kempton & White, 2009). Outra possibilidade é o tratamento com produtos de desvio (“*bypass*”), que produzem a hemostasia através da eliminação do passo dependente do FVIII e do fortalecimento da geração de trombina. Dois desses tratamentos (concentrado do complexo de protrombina ativado, aPCC, e Fator Recombinante VIIa, rFVIIa) vêm sendo

utilizados, inclusive no Brasil, mas há discussão sobre o custo-benefício de cada um (Goudemand, 1999; Ozello *et al.*, 2007; Carlsson *et al.*, 2008).

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

A formação de inibidor é a principal complicação do tratamento da hemofilia, que interfere na resposta clínica à infusão do FVIII e resulta em morbidade significativa (Scandella *et al.*, 1993; Ragni *et al.*, 2009). A maior parte dos anticorpos (inibidores) pertence à classe de imunoglobulinas IgG (Rieger, 1996) e liga-se a importantes domínios funcionais do FVIII, evitando sua interação com outros fatores de coagulação (tais como os fatores IIa, IXa, X e von Willebrand) e fosfolipídios. Outros inibidores possuem atividade catalítica e hidrolisam a proteína (Lacroix-Desmazes *et al.*, 1999; Reipert *et al.*, 2006).

A frequência de inibidores situa-se em geral entre 25-30% nos pacientes graves e 5% nos pacientes com as formas moderada e leve (Hoyer, 1995). Considerando pacientes graves, moderados e leves, a incidência de inibidores foi estimada em 20% no Brasil (Rieger & Roisenberg, 1999). No Rio Grande do Sul, a incidência de inibidores nos hemofílicos graves é de 40% (Leiria *et al.*, 2009).

Estudos indicam que o desenvolvimento de inibidores contra o fator VIII é uma resposta imune multifatorial complexa, na qual estão envolvidos fatores genéticos e adquiridos (Astermark *et al.*, 2005; Van den Berg & Chalmers, 2009). A produção dos mesmos pode variar conforme a idade e a origem étnica dos pacientes, bem como a dose administrada, a frequência de exposição e a atividade do agente terapêutico (Nilsson & Lamme, 1993). Quanto às origens étnicas, pacientes de origem afro-americana e latina parecem apresentar um risco duas vezes maior do que euro-descendentes (Aledort & Dimichele, 1998; Ghosh & Shetty, 2009). Quanto à idade, alguns estudos sugeriram que existiria um risco maior de desenvolver inibidores quando o FVIII fosse administrado nos primeiros anos de vida; porém, esses resultados não foram confirmados em outros trabalhos (Santiagostino *et al.*, 2005; Ghosh & Shetty, 2009).

Entre os fatores de risco genéticos, encontram-se alterações no gene do FVIII, tais como mutações de sentido trocado, grandes deleções, mutações sem sentido e as inversões dos íntrons 22 e 1 (Nilsson & Lamme, 1993; Kempton & White, 2009). Na hemofilia A grave, mutações que resultam na ausência ou na formação de uma proteína truncada do FVIII estão associadas com um risco de 20-80% de desenvolvimento do inibidor (Ghosh & Shetty, 2009). Além disso, variações individuais na resposta imune também podem influenciar o risco de desenvolvimento de inibidores em pacientes com HA grave (Astermark *et al.*, 2006a, b, 2007; Kempton & White, 2009; Agostini *et al.*, submetido).

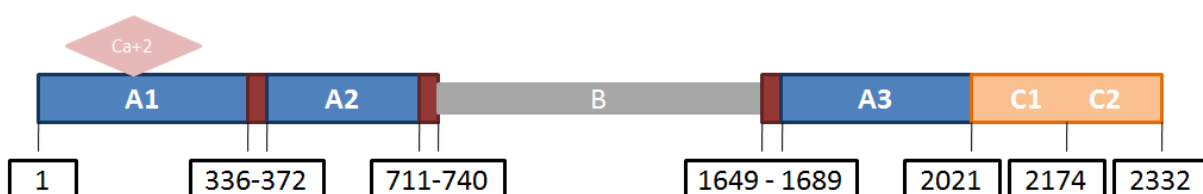
### **3. O Fator VIII (FVIII)**

Como já indicado, o FVIII é uma glicoproteína que atua como cofator para o Fator IXa na conversão do Fator X em Fator Xa na via intrínseca da coagulação. O Fator Xa ativa a protrombina (Fator II) em trombina (Fator IIa) que, por sua vez, converte o fibrinogênio em fibrina (Tuddenham & Cooper, 1994). No plasma, o FVIII forma um complexo não covalente com o FvW, e esse complexo é necessário para a manutenção dos níveis normais de FVIII. Essa ligação evita a formação prematura do complexo Xase, que promove a ativação do FVIII, e também protege contra a sua inativação pela proteína C ativada, FIXa e FXa (Fay, 2004 *apud* Terraube *et al.*, 2010).

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

O gene do FVIII localiza-se no cromossomo Xq28, compreende 186 kb e está organizado em 26 éxons. Os íntrons representam 95% do gene (177 kb), e os éxons, constituem-se, portanto, nos restantes 5% (9 kb) (Gitschier *et al.*, 1984; Toole *et al.*, 1984). O RNA mensageiro (mRNA) do fator VIII compreende 9.010 nucleotídeos que codificam um polipeptídeo precursor de 2.351 aminoácidos. Após o processamento

do peptídeo sinal (19 aminoácidos), origina-se uma proteína madura de 2.332 aminoácidos (Vehar *et al.*, 1984). A proteína madura foi isolada e purificada por Fay *et al.* (1982) e sua estrutura primária foi primeiramente descrita em 1984 (Gitschier *et al.*, 1984; Vehar *et al.*, 1984). A partir da análise de sequências de nucleotídeos e aminoácidos, observou-se a existência de regiões de homologia interna no FVIII, sendo estabelecidos 3 domínios estruturais diferentes, denominados, A, B e C, abreviados como NH<sub>2</sub>-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH (Vehar *et al.*, 1984). Os domínios A são flanqueados por pequenos espaçadores (a1, a2 e a3), os quais contêm *clusters* de resíduos de ácido aspártico e glutamina, chamados de regiões ácidas (Lenting *et al.*, 1998). A Figura 3 apresenta um modelo esquemático dos domínios do FVIII.

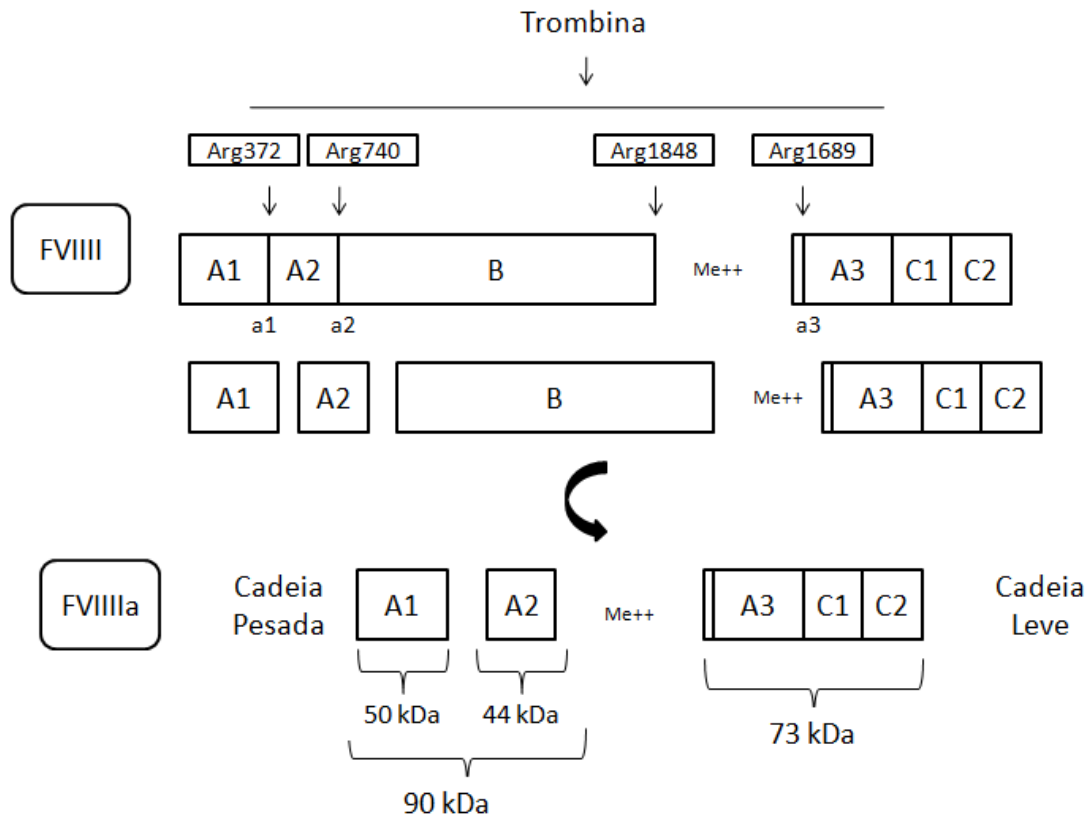


**Figura 3: Domínios do FVIII.** Os números dos resíduos que dividem os domínios estão representados abaixo do esquema. Os domínios A e C estão representados em azul e laranja, respectivamente. As regiões ácidas estão representadas em vermelho. O domínio B, em cinza, está representado fora de escala. Um sítio previsto de ligação ao cálcio está indicado (Adaptado de Fay, 2004).

O fator VIII é sintetizado principalmente nos hepatócitos (Wion *et al.*, 1985). Para ser secretado no plasma, o FVIII é formado intracelularmente em uma série de heterodímeros ligados a íons metálicos produzidos por clivagem na junção A3-B e por outras clivagens adicionais no domínio B. Estas clivagens dão origem à cadeia pesada, constituída pelos domínios A1 (aminoácidos 1-372), A2 (aminoácidos 373-740) e B (aminoácidos 741-1698), e à cadeia leve, constituída pelos domínios A3 (aminoácidos 1690-2021), C1 (aminoácidos 2022-2174) e C2 (aminoácidos 2175-2332). As regiões ácidas localizam-se nas regiões de 336-372 (a1), 711-740 (a2) e 1649-1689 (a3) (Saenko *et al.*, 2002; Fay, 2004).

No local do evento de coagulação, o FVIIIa é ativado pela trombina nos resíduos da junção entre A1-A2, nos resíduos Arg372 e Arg740, na cadeia pesada e entre B-A3, no resíduo Arg1689, na cadeia leve do FVIII (Fang *et al.*, 2006). Após a

ativação do FVIII, o domínio B é removido. A figura 4 mostra a representação esquemática da ativação do FVIII.



**Figura 4: Ativação do FVIII.** O diagrama mostra o tamanho esperado dos fragmentos e a clivagem da trombina nos sítios Arg372, Arg740 e Arg1689 (Adaptado de Fang *et al.*, 2006).

O FVIII se liga a dois íons cobre, em sítios internos aos domínios A1 e A3. No domínio A1 o íon cobre liga-se à His267, Cys310 e His315. O domínio A3 liga-se à His1954, Cys2000 e His2005. Esses íons cobre estão localizados próximos, mas não na interface do domínio, indicando que o seu papel em aumentar a interação entre a cadeia leve e a cadeia pesada é indireto (Chi Ki Ngo *et al.*, 2008).

É especulado que, entre os resíduos 108-124, há um sítio de ligação ao cálcio (Wakabayashi *et al.*, 2002), que pode ter um papel na manutenção da interface entre os domínios C2 e A1 (Chi Ki Ngo *et al.*, 2008). Venkateswarlu (2010) refere-se a estudos bioquímicos nos quais o FVIII poderia ter um segundo sítio de baixa afinidade com o cálcio, sendo este ligado aos domínios A, contribuindo para a afinidade entre os domínios A2 e A3.

A estrutura tridimensional do FVIII, com o domínio B removido, encontra-se representada na Figura 5.

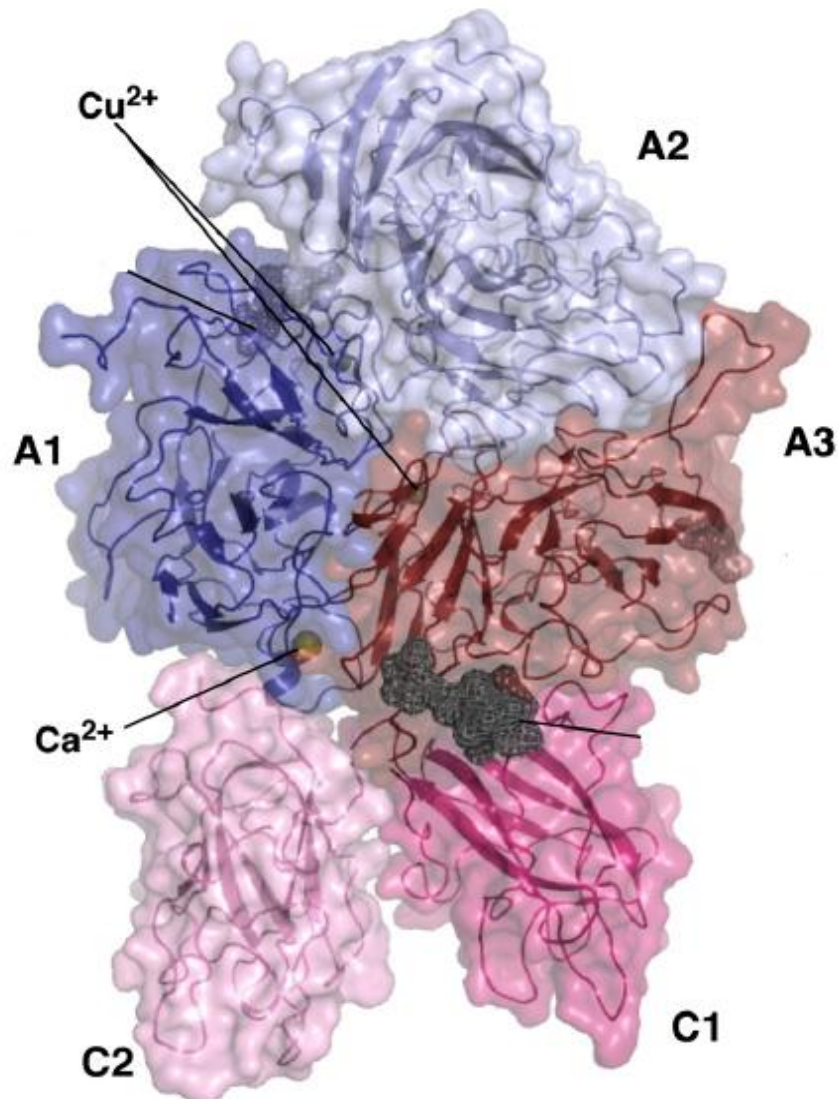


Figura 5: A estrutura tridimensional do FVIII com o domínio B deletado. O domínio A1 (resíduos 1-335) e a região acídica a1 (resíduos 336-372) estão representados em azul escuro. O domínio A2 (resíduos 373-710) e a região acídica a2 (resíduos 711-740) estão representados em azul claro. Essas regiões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

Os diferentes domínios do FVIII têm um papel importante na função da proteína e cada domínio apresenta sítios de ligação para diferentes componentes da

cascata de coagulação (Lenting *et al.*, 1998). A parte C-terminal acídica da subunidade A1 contém um sítio de interação com o FX (Lappan & Fay, 1998), o domínio A2 tem vários sítios de ligação com o FIX (Fay & Scandella, 1999) e um com o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP) (Lenting *et al.*, 1999), o domínio A3 tem um sítio de ligação para o FIX (Lenting *et al.*, 1996). LRP, FvW e fosfolípidios interagem com o domínio C2 (Takeshima & Fujikawa, 1999).

O domínio B não é necessariamente direcionado à atividade central pró-coagulante do FVIII, mas apresenta diferentes funções, tais como o controle de qualidade da síntese do FVIII; ele também aumenta a eficiência de secreção do FVIII, participa de sua ativação e da ligação às plaquetas (Pipe, 2009).

Quanto à ligação com o FvW, três regiões do FVIII estão diretamente envolvidas: a3 (aminoácidos 1649-1689) e duas regiões no domínio C2 (aminoácidos 2181-2243 e 2303-2332) (Saenko *et al.*, 2002). A clivagem da cadeia leve do FVIII (em Arg1689) durante a ativação conduz à dissociação do FvW do FVIII e à interação competitiva do FVIII clivado com o fosfolípido de membrana de superfície torna a interação dominante (Fay, 2004).

A ligação com o FIXa ocorre em superfícies fosfolípídicas aniônicas com alta afinidade. Dois domínios do FVIII parecem estar envolvidos: o domínio A2 (resíduos 484-509; 511-530; 558-565; 698-712) e o domínio A3 (resíduos 1811-1818) (Fay, 2004). A Figura 6 indica a associação entre o FVIIIa e o FIXa.



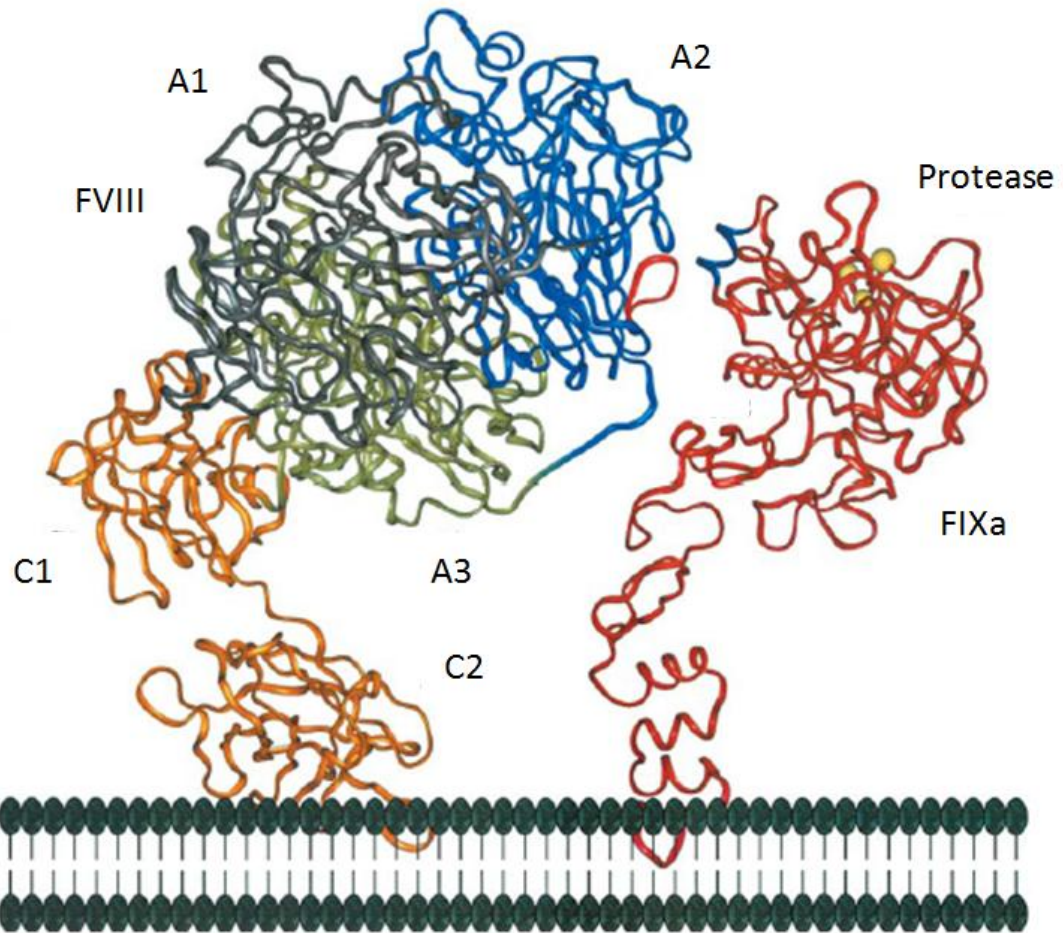


Figura 6: O FVIIIa (à esquerda) e o FIXa (à direita) – Complexo Xase - associados a uma superfície fosfolipídica (Adaptado de Fay, 2004).

### 3.2. Mutações no Gene do FVIII e a Hemofilia A

Dentre as mutações no gene do FVIII que causam hemofilia A grave, as duas mais comumente encontradas são as inversões do íntron 22 e do íntron 1, nas frequências de 40-50% e 5% dos pacientes, respectivamente (Andrikovics *et al.*, 2003). No Rio Grande do Sul, as frequências encontradas foram de 42,9% e 2,8%, respectivamente (Leiria *et al.*, 2009).

O íntron 22 contém uma região de 9,5 kb, a qual está presente fora do gene, próxima ao telômero do cromossomo X, em duas cópias adicionais. O grau de

identidade e a direção oposta das cópias extragênicas, comparadas à região homóloga intragênica, promove a recombinação intracromossômica durante a gametogênese masculina, e contribui para a ocorrência desse rearranjo na região. Dependendo de qual região homóloga extragênica está envolvida, foram descritos dois tipos principais de inversões: tipo 1 ou distal (Int22h3) e tipo 2 ou proximal (Int22h2) (Antonarakis *et al.*, 1995).

Bagnall *et al.* (2002) demonstraram que a inversão no íntron 1 deriva de uma recombinação homóloga entre duas sequências idênticas de 1.041 pares de bases, int1h-1 e int1h-2, que estão orientadas em direções opostas e posicionadas no íntron 1 do gene e numa região telomérica, respectivamente.

De acordo com o banco de dados online Haemophilia A Mutation Database (HAMSTeRS, 2012), existem 1.209 mutações que resultam em hemofilia A nas formas grave, moderada ou leve, que incluem mutações pontuais, das quais 48% resultam na mudança de um aminoácido da sequência original (mutação de sentido trocado), 11% levam à criação de códons de parada (mutação sem sentido), 8% dão origem a um processamento do RNA mensageiro alterado ou ausente, 16% são pequenas deleções e 7% são inserções. Também neste banco de dados, existem 135 grandes deleções (de 1 kb até 210 kb) descritas; o mecanismo de sua formação é provavelmente a recombinação não-homóloga, e elas são responsáveis por cerca de 5% dos casos de hemofilia A grave. As grandes deleções podem ser em um ou mais éxons. A frequência de mutações encontradas em hemofílicos A graves encontra-se descrita na Tabela 1.

**Tabela 1. Distribuição das mutações já descritas em hemofílicos A graves, entre os 26 éxons do FVIII.**

<b>Éxon</b>	<b>Mutações de sentido trocado</b>	<b>Mutações sem sentido</b>	<b>Mutações em sítios de <i>processamento</i></b>	<b>Pequenas deleções</b>	<b>Inserções</b>	<b>Total</b>
<b>1</b>	11	2	5	2	1	21
<b>2</b>	8	1	5	6	3	23
<b>3</b>	17	0	7	4	0	28
<b>4</b>	18	7	2	2	1	30
<b>5</b>	2	2	7	4	1	16
<b>6</b>	8	2	5	5	2	22
<b>7</b>	12	3	4	9	0	28
<b>8</b>	12	4	1	6	1	24
<b>9</b>	11	3	1	7	5	27
<b>10</b>	4	4	2	5	0	15
<b>11</b>	10	1	1	3	1	13
<b>12</b>	12	5	2	2	1	22
<b>13</b>	12	3	2	8	2	27
<b>14</b>	19	41	3	84	43	190
<b>15</b>	7	2	4	3	0	16
<b>16</b>	7	9	1	6	0	23
<b>17</b>	19	2	2	5	4	32
<b>18</b>	10	5	4	6	4	29
<b>19</b>	5	2	8	4	3	22
<b>20</b>	3	1	0	1	2	7
<b>21</b>	3	4	1	0	1	9
<b>22</b>	7	5	3	3	3	21
<b>23</b>	7	3	3	8	0	21
<b>24</b>	3	3	0	2	1	9
<b>25</b>	6	3	0	8	1	18
<b>26</b>	12	1	0	9	0	22
<b>Total</b>	245	118	72	202	80	

**Fonte: HAMSTeRS (2012).**

Embora existam vários trabalhos publicados que descrevem mutações (HAMSTeRS), realizados em diferentes populações de hemofílicos A, o estudo das mesmas permanece sendo importante, pois possibilita uma melhor compreensão da genética molecular da doença na população estudada, assim como as relações estrutura-função das proteínas originadas por essas mutações. Recentemente, diversos estudos têm contribuído para o entendimento das mutações que originam a hemofilia A. A Tabela 2 mostra uma compilação dos resultados obtidos nos principais trabalhos; muitas das mutações listadas foram encontradas pela primeira vez na população investigada. Os trabalhos citados são bastante heterogêneos quando ao número de indivíduos investigados; alguns estudam hemofílicos severos, moderados e leves, outros apenas severos ou moderados e leves. Ainda, muitos trabalhos incluem familiares de hemofílicos no número total de indivíduos investigados.

**Tabela 2. Estudos de mutações em hemofílicos A em diferentes populações no mundo.**

População	N° indiv.	Inv22	Inv1	Mutações de ponto*	Grandes deleções	Referências
<b>América</b>						
Argentinos	173	25	1	29	10	Rosseti <i>et al.</i> (2007)
Brasileiros/1	31	3	-	3	4	Figueiredo <i>et al.</i> (1994)
Brasileiros/2	42	12	-	21	1	Arruda <i>et al.</i> (1995)
Chilenos	10	1	0	3	-	Poggi <i>et al.</i> (2011)
Venezuelanos	54	22	0	22	3	Albanez <i>et al.</i> (2011)
<b>Ásia</b>						
Árabes	20	11	-	9	-	Abu-Amero <i>et al.</i> (2008)
Coreanos/1	38	15	1	14	3	Hwang <i>et al.</i> (2009)
Coreanos/2	22	7	0	12	1	Chur-Woo <i>et al.</i> (2010)
Chineses	18	0	-	18	-	Hua <i>et al.</i> (2010)
Indianos/1	75	22	2	32	12	Ahmed <i>et al.</i> (2005)
Indianos/2	47	11	0	27	-	Nair <i>et al.</i> (2010)
Iranianos	588	201	5	124	12	Ravanbod <i>et al.</i> (2011)
Jordãos	175	66	1	108	-	Awidi <i>et al.</i> (2010)
Taiwaneses	115	32	6	21	-	Chen <i>et al.</i> (2010)
<b>Europa</b>						
Albaneses	37	2	-	10	4	Castaman <i>et al.</i> (2007)
Austriacos	239	72	4	49	2	Reitter <i>et al.</i> (2010)
Espanhóis/1	287	-	-	137	-	Venceslá <i>et al.</i> (2008)
Espanhóis/2	109	20	3	23	-	Fernandez-Lopez <i>et al.</i> (2005)
Espanhóis/3	116	52	3	56	6	Casãna <i>et al.</i> (2008)
Franceses/1	128	-	-	100	22	Vinciguerra <i>et al.</i> (2006)
Franceses/2	406	111	3	95	-	Cruillet <i>et al.</i> (2006)
Franceses/3	120	21	0	47	-	Repscé <i>et al.</i> (2007)
Holandeses	137	10	3	95	-	Boeckhorst <i>et al.</i> (2005)
Inglêses/1	51	8	3	27	-	Hill <i>et al.</i> (2005)
Inglêses/2	-	131	13	834	11	Green <i>et al.</i> (2008)
Italianos/1	76	30	1	39	6	Salviato <i>et al.</i> (2007)
Italianos/2	40	5	-	7	2	Santacroce <i>et al.</i> (2008)
Italianos/3	201	-	-	78	-	Riccardi <i>et al.</i> (2010)
Portugueses/1	177	73	2	49	19	David <i>et al.</i> (2006)
Portugueses/2	53	26	2	21	3	Silva-Pinto <i>et al.</i> (2012)
<b>Oceania</b>						
Neozelandeses	45	14	3	6	2	Laurie <i>et al.</i> (2007)

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

### 3.2.1. Correlações Genótipo-Fenótipo: O Tipo de Mutação e o Desenvolvimento de Inibidores Anti-FVIII

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

Oldenburg & Pavlova (2006) realizaram um estudo com o tipo de mutação e o título dos inibidores, em pacientes hemofílicos A graves com inibidores. A Tabela 3 apresenta os resultados encontrados. Nesse estudo, observa-se a baixa proporção de altos títulos de inibidores (>5 Unidades Bethesda/mL) em pacientes com mutações de sentido trocado (21%), enquanto pacientes com grandes deleções apresentaram uma grande proporção desses títulos (69%). As mutações em sítios de processamento não podem ser consideradas, pelo baixo número de pacientes registrados.

**Tabela 3. Distribuição dos altos títulos de inibidores, em relação ao tipo de mutação em 201 pacientes com inibidores (Adaptado de Oldenburg & Pavlova, 2006).**

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

Gouw *et al.* (2010) também estudaram a influência do tipo de mutação com o desenvolvimento de inibidores. A Tabela 4 mostra os resultados encontrados nesse

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

**Tabela 4. Tipo de mutação no gene do FVIII e o desenvolvimento de inibidores (Adaptado de Gouw *et al.*, 2010).**

Mutações	Nº pacientes	Pacientes com inibidores		Inibidor de alto título (%)
		N	%	
Grandes Deleções	3	2	67	67
Mutações sem Sentido	20	6	30	5
Inversões dos Íntrons 1/22	100	27	27	10
Pequenas Deleções/Inserções	54	4	7	4
Mutações de Sentido Trocado	51	3	6	2
Mutações de Sítio de <i>Splicing</i>	13	1	8	0
Total	318	43	13	9

### 3.2.2. Análise Estrutural para o Melhor Entendimento da Relação Estrutura-Função

Uma vez conhecida a estrutura da proteína, torna-se possível avaliar os possíveis efeitos de alterações em regiões específicas da mesma, bem como o desenho de experimentos para aprimorar o conhecimento de seu mecanismo de ação. Foram desenvolvidas ferramentas computacionais para a imagem gráfica de

uma estrutura protéica, para a manipulação dessa estrutura “*in silico*” e para o cálculo de diferentes energias de interação entre seus diferentes domínios.

Ao compreender o efeito que uma mutação exerce em uma proteína, obtém-se subsídios para uma melhor avaliação de sua função, bem como suas interações entre ela e estruturas afins. Uma série de trabalhos vêm sendo feitos, descrevendo novas mutações e seus possíveis efeitos na proteína (FVIII). A Tabela 5 mostra alguns exemplos de mutações de sentido trocado recentemente estudadas, em pacientes graves.

**Tabela 5. Mutações recentemente estudadas por bioinformática.**

<b>Mutação</b>	<b>Efeito Previsto por Bioinformática</b>	<b>Referência</b>
p.L71P	Distúrbio na conformação de alça e alteração em pontes de hidrogênio	Silva-Pinto <i>et al.</i> (2012)
p.L172F	Provoca impedimento estérico no domínio A1	Albáñez <i>et al.</i> (2011)
p.G1994R	Altera sítio de ligação ao cálcio no domínio A1	Albáñez <i>et al.</i> (2011)
p.C1858Y	Altera ponte dissulfídica no domínio A3 do FVIII	Albáñez <i>et al.</i> (2011)
p.G2325D	Alteração na porção C-terminal do FVIII	Albáñez <i>et al.</i> (2011)
p.R282H	Altera o sítio de interação entre os domínios A1 e A2	Chur-Woo <i>et al.</i> (2010)
p.G1981V	Pode desestabilizar a interação entre os domínios A2 e A3	Chur-Woo <i>et al.</i> (2010)
p.R1997W	Altera a interação com o cobre	Chur-Woo <i>et al.</i> (2010)



O presente estudo teve por **objetivo geral** a caracterização molecular das alterações genéticas em pacientes com hemofilia A grave residentes no Rio Grande do Sul.

Os **objetivos específicos** foram: (a) correlacionar os tipos de alterações encontradas com a prevalência de inibidores do Fator VIII; (b) através da análise estrutural estabelecer relações estrutura-função do FVIII; e (c) contribuir para um melhor conhecimento dos pacientes que vivem em nosso meio, visando estratégias de manejo diferenciadas.

## **Characterization of Causative Mutations in Patients with Severe Hemophilia A in Southern Brazil**

Roberta P. Gorziza, Igor A. Vieira, Djenifer B. Kappel, Clévia Rosset, Marialva Sinigaglia, Leonardo B. Leiria, Francisco M. Salzano and Eliane Bandinelli

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

**KEY WORDS:** FVIII mutations; Brazilian hemophiliacs; severe hemophilia A; molecular structural analysis

---

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

**ABSTRACT:** Hemophilia A (HA) is an X-linked inherited bleeding disorder caused by reduced or absent clotting factor VIII (FVIII) activity, determined by heterogeneous mutations in the FVIII gene. Identification of these pathogenic mutations is important as a basis for genetic counseling and the assessment of clinical manifestations. Although more than 700 mutations of the FVIII gene have been reported as responsible for severe hemophilia (FVIII: C<1%), the corresponding data is currently insufficient for southern Brazilian populations. The present report studied the genetic changes in 48 unrelated severe HA patients, who showed negative results for introns 22 and 1 inversions. One gross deletion (including exons 4, 5 and 6), nine small deletions, five small insertions, eight missense and six nonsense mutations were found, of which thirteen were recurrent and sixteen were novel, never reported in the HAMSTeRS database. Forty-four per cent of these mutation carriers developed FVIII inhibitors; and molecular structural analysis suggested that D542G and S109P may interfere with calcium binding, while L2297R clearly affects the molecule's electrostatic surface.

## Introduction

Hemophilia A (HA) is an X-linked inherited bleeding disorder caused by reduced or absent clotting factor VIII (FVIII) activity. This disease affects about 1 in 5000 males, who suffer from joint and muscle bleedings, and easy bruising. Hemophilia A severity is defined according to FVIII activity (FVIII: C) levels in plasma. Severe hemophilia A patients have a FVIII: C level of less than 0.01 IU/dl; moderate, levels of 0.01-0.05 IU/dl (1-5%) and mild levels of > 0.05-0.40 IU/dl (5-40%) [White et al., 2001]. The FVIII gene is mapped to the X-chromosome long arm (Xq28), spans 186 kb and consists of 26 exons, which represent 5% of the gene. The mature secreted protein is composed of 2332 amino acids in six domains: A1, A2, B, A3, C1, and C2 [Gitschier et al., 1984]. These domains play an important role in FVIII function and each have specific binding sites for different components of the clotting cascade [Lenting et al., 1998]. The acidic C-terminus of the A1 subunit contains a factor X (FX) interactive site [Lapan and Fay, 1998]; the A2 domain has several binding sites for factor IX (FIX) [Fay and Scandella, 1999], and one for the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) [Lenting et al., 1999]; and the A3 domain has a binding site for FIX [Lenting et al., 1996]. LRP, von Willebrand factor (FvW) [Saenko and Scandella, 1997] and phospholipids [Takeshima and Fujikawa, 1999]; all interact with the C2 domain.

The identification of pathogenic mutations is of fundamental importance for genetic counseling and for genotype/phenotype assessments. The most common gene defects in severe HA are the intron 1 and intron 22 inversions, which occur in 0% to 5% and 40-49% of patients, respectively [Leiria et al., 2009]. In the remaining severe HA patients, a variety of nonsense, missense, splice-site, frameshift mutations and large deletions or insertions have been detected [HAMSTeRS, 2012].

The aim of the present study was to identify the genetic changes in 48 unrelated severe HA patients living in the southern Brazilian state of Rio Grande do Sul, which showed negative results for introns 1 and 22 inversions [Leiria et al., 2009]. A mutational screening detected 16 novel mutations. These and the others found were examined for (a) effects in inhibitor formation; and (b) structure/function relationships through molecular structural analysis.

## **Materials and Methods**

### **Patients and DNA Extraction**

Out of 107 unrelated male patients having severe haemophilia A who are assisted by Rio Grande do Sul's (Brazil) Center of Hematology and Hemotherapy (HEMOCENTRO-RS), 48 without inversions 22 and 1 were investigated. The average age of the patients was  $21 \pm 11$  years and 93% of them were of European descent, 7% being of African or mixed origin, as ascertained by visual inspection. The control group for the validation of the novel mutations was composed by blood bank donors; 85% of them were of European descent and 15% of African origin. Patients, their parents, or legal representatives gave their consent to participate in the study. The investigation was approved by the Federal University of Rio Grande do Sul Ethics Committee. Blood samples were collected in tubes with sodium citrate and DNA extraction was carried out by nonenzymatic and salting-out methods [Miller et al., 1988; Lahiri and Nurnberger, 1991].

### **FVIII and inhibitor assays**

Factor VIII coagulation activity (FVIII: C) was measured using the one stage clotting assay as per standard technique [Austen and Rhymes, 1985]. FVIII inhibitors were determined using the standard Bethesda assay [Kasper et al., 1975]. The absence of inhibitor was defined as less than 1 BU/mL [Kasper, 1995].

### **Detection of Large Deletions and Screening of the FVIII Gene**

Gross exon deletion determinations were performed by multiplex PCR, with a total of 35 exon-specific primers, for the 26 exons and 3'- and 5' - UTR, as previously described [Hwang et al., 2009]. Primers were grouped by eight sets according to the expected size of the PCR product. Large deletions were defined as the consistent inability to amplify a particular exon.

FVIII genotyping was performed by amplification with Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Life Technologies, Foster City, CA, USA), for all 26 exons,

including the 3'-UTR and 5' UTR, using the 35 synthesized primers [Hwang et al., 2009]. Sequencing was conducted by Macrogen Inc. (Seoul, Korea). Sequence variations were analyzed with CodonCodeAligner software. The wild-type FVIII gene (gene accession - NCBI: NG\_005114.1) was utilized as reference. Mutation data were confirmed using the MEGA5.04 program, and compared to the HAMSTeRS database [HAMSTeRS, 2012]. All sequence changes were confirmed on both strands by using a second amplicon. For the nomenclature of the mutations, the numbering system of HAMSTeRS (2012) was used.

### **Analysis of Missense Mutations**

Novel causative mutations were determined according to the following criteria: (i) no other nucleotide variation was found in the FVIII coding region or in intron-exon boundaries; (ii) it was not detected in 100 X-chromosomes from the general male southern Brazilian population; (iii) when the DNA from a member of the family was available, the mutation was confirmed; (iv) an algorithm was used to predict the impact of missense mutations on protein structure and function (PolyPhen-2; Polymorphism Phenotyping-2 <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). PolyPhen-2 [Adzhubei et al., 2010] is an automatic tool for the prediction of the possible impact of an amino acid substitution for another on the structure and function of a human protein. This prediction is based on a number of features comprising the sequence, phylogenetic and structural information characterizing the substitution. PolyPhen-2 predicts variants as “benign”, “possibly damaging”, or “probably damaging” accompanied by a prediction confidence score ranging between 1 (probably damaging) to 0 (benign). The effect of these mutations was also analyzed by SDM (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/sdm/sdm.php>). SDM [Worth et al., 2011] predicts the effect that single point mutations have on protein stability. The method is based on the knowledge of observed substitutions that have occurred in homologous proteins and which are encoded in environment-specific substitution tables. SDM calculates a stability score which is analogous to the free energy difference between a wild-type and mutant protein. The stability score predictions are useful for designing site-directed mutagenesis experiments or for predicting whether a mutation will impact protein structure and have a role in disease.

## **Molecular Structural Analysis**

The crystal structure of FVIII (2R7E) available at the Protein Data Bank (PDB - <http://www.rcsb.org/pdb/home/>) was used to localize the mutations found in the patients; the image was generated with the software PyMol molecular viewer (<http://www.pymol.org/>). For the C2 domain macromolecular structure and electrostatic surface visualization, the GRASP2 program was used [Petrey and Honig, 2003].

## **Results and Discussion**

In a total of 48 severe HA unrelated male patients, the FVIII gene was investigated and likely causative mutations were identified in 34 of them (70%). In 14 patients, no DNA sequence alteration could be identified. For the remaining 34, 29 different mutations were identified: 1 large deletion, 9 small deletions, 5 small insertions, 6 nonsense and 8 missense changes. Sixteen are novel mutations, never reported in the HAMSTeRS database and distributed by almost all domains, excepting C1 (Table 1). These novel mutations had a single occurrence, except for one small insertion in intron 15, which occurred twice. Seven of them have been associated with inhibitor formation in the respective patient. Previously described mutations are listed at Table 2. Figure 1 shows the localization of the missense mutations. Six (18%) of the 34 mutations (c.586-587 ins TA, p.W513X, p.P2205R, c.208-211 del TTGT, p.G247X, and p.E810X) were confirmed in at least one relative of the proband.

Detailed information about the sixteen novel mutations listed in Table 1 follows. One of them was a nonsense mutation (p.W513X) which resulted in a premature introduction of a stop codon in exon 11.

Nine mutations led to frameshift changes; five of them were caused by one or five bases deletions (c.1703 delG, c.3151-3155 delATATT, c.4936 delG, c.5019 delT, and c.5930 delT), and introduced a premature stop codon in exons 11, 14 (three of them) and 18, respectively. Another was a two bases insertion (c.586-587 insTA), which introduced a premature stop codon in exon 4. One deletion (c.5626-32

delTCTGCC) in exon 17 and one insertion (c.6479-6484 insTTTTTA) in exon 23 did not lead to a premature stop codon, but resulted in changes of amino acids that were predicted as “probably damaging” and “possibly damaging” respectively, by the Polyphen-2 software. In exon 17, the change led to p.V1857D and in exon 23 to p.N2138F. One insertion (IVS15 + 1379insT) occurred in intron 15, at the border of exon 16.

Six novel missense mutations were identified: p.I76T, p.N90Y, p.S109P, p.W393L, p.P2205R and p.L2297R, all predicted as “probably damaging” by Polyphen-2.

In the HAMSTeRS database a p.I76N mutation was described in a severe haemophilia A patient, in the same place as ours, p.I76T. Change at this position, therefore may be highly damaging to the molecule. SDM also predicted these mutations to be highly destabilizing and as cause for protein malfunction and disease.

We could find one description of an asparagine for histidine change at codon 90, similar to our p.N90Y change, but it is not informed if the patient had a severe, moderate or mild phenotype. Considering protein stability, this mutation was predicted as neutral by SDM, but p.N90Y was classified as probably damaging by polyphen.

p.S109P mutation is located on the A1 domain, between residues 108-124, which may contain a putative Ca<sup>+2</sup> site [Wakabayashi et al., 2002], suggesting that this mutation may alter the connection between FVIII and calcium (Figure 1). SDM predicted this mutation as slightly destabilizing.

HAMSTeRS described two mutations that take place at codon 393: p.W393G and p.W393R, in severe haemophilia A patients. We found the p.W393L mutation; this codon may probably play a very important role in FVIII protein, since different amino acid changes are the cause for severe hemophilia A. SDM predicted this mutation as highly destabilizing. The 2205P amino acid is located in a region of the FVIII C2 domain that interacts with the von Willebrand Factor (FvW) (2181-2243) [Saenko et al., 2002]. It is probable, therefore, that p.P2205R interferes with this connection. But this mutation was predicted as stabilizing by SDM.

p.L2297R mutation is not located in a region known as a functional site, and was predicted by SDM as only slightly destabilizing. However, since Polyphen-2 predicted this mutation as “probably damaging”, a comparison between wild and



mutated residues was made (Figure 2), indicating a pronounced positive charge change in the C2 domain on the mutated residue. This change of charge may interfere in the interaction of FVIII with other proteins.

Table 2 lists the mutations found by us that had been already previously described as causing hemophilia. They occur in all domains of the protein and can be classified as multiple mutation types. The two missense mutations (p.D542G and p.G549V) were predicted by Polyphen-2 as “probably damaging”, both with a confidence score of 1. SDM predicted both mutations as highly destabilizing.

We have been recently much interested in the causes of inhibitors formation in severe hemophilia A patients [Leiria et al., 2009; D. Agostini et al., submitted]. It is therefore of note that of the 12 comparisons possible 9 (75%) were concordant with previous data about the influence of the listed mutations in inhibitors development. Combining the data of Tables 1 and 2 we have a prevalence of this condition in 15 (44%) of the 34 patients. Three of these antibodies were of high titer (*cf.* Tables 1 and 2). This prevalence by mutation type is as follows: (a) small deletions/insertions: 8/16, 50%; (b) nonsense: 5/9: 55%; (c) missense: 1/8: 12%; and (d) large deletion: 1/1: 100%. These results confirm previous studies [Oldenburg and Pavlova, 2006; Gow et al., 2011] suggesting a higher risk of inhibitors development in patients with large deletions, small deletions/insertions, and nonsense mutations than in patients with missense mutations.

p.D542G missense mutation is located on a second low-affinity calcium ion bound region that contribute to inter-domain affinity at the interface between domains A2 and A3 [Petrey and Honig, 2003; Venkateswarlu, 2010], and therefore may lead to the destabilization of the protein (Fig. 1).

We also found mutations previously described as polymorphisms in HAMSTeRS, their amino acid changes and prevalence (%) being as follows: p.D1241E, 17; p.S1269S, 12; and p.M2238V, 4; as well as a change in IVS18, nt.118809 T>A, 27; and in addition observed three new, non-described mutations (in one patient each), that were classified as benign by Polyphen-2. They were: p.S1398T; p.S1489Y; and p.A1993G.

No mutation was identified in 14 of the patients studied. It is possible that the causes of hemophilia A among them are outside of the region analyzed, in intronic sequences or sites which might affect transcription or translation.

## **Acknowledgements**

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

## References

- Adzhubei IA, Schimidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7: 248-249.
- Austen DEG, Rhymes IL. 1985. *A Laboratory Manual of Blood Coagulation*. Oxford: Blackwell Scientific, 109 p.
- Fay PJ, Scandella D. 1999. Human inhibitor antibodies specific for the factor VIII A2 domain disrupt the interaction between the subunit and factor IXa. *J Biol Chem* 274: 29826-29830.
- Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM. 1984. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 312: 326-330.
- Gouw SC, Van der Bom JG, Van der Berg HM, Zewald RA, Ploos Van Amstel JK, Mauser-Bunschoten EP. 2011. Influence of the type of F8 gene mutation on inhibitor development in a single centre cohort of severe haemophilia A patients. *Haemophilia* 17: 275-281.
- HAMSTeRS (*Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site*). Haemophilia A –summary of unique mutations reported. Available at: <http://hadb.org.uk/> (last accessed on 4 January 2012).
- Hwang SH, Kim MJ, Lim JA, Kim HC, Kim HS. 2009. Profiling of factor VIII mutations in Korean Hemophilia A. *Haemophilia* 15: 1311-1317.
- Kasper CK. 1995. Laboratory tests for factor VIII inhibitors, their variation, significance and interpretation. *Blood Coagul Fibrin* 2: 7-10.
- Kasper CK, Aledort LM, Aronson D, Counts RB, Edson JR, Fratantoni J, Green D, Hampton J, Hilgartner M, Levine P, Lazerson J, McMillan C, Penner J, Shapiro S, Shulman NR.. 1975. A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh* 34: 869-872.
- Lahiri DK, Nurnberger J. 1991. A rapid nonenzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucl Acids Res* 19: 5444.
- Lappan KA, Fay PJ. 1998. Interaction of the A1 subunit of factor VIII and the serine protease domain of factor X identified by zero-length cross-linking. *Thromb Haemost* 80: 418-422.

- Leiria LB, Roisenberg I, Salzano FM, Bandinelli E. 2009. Introns 1 and 22 inversions and factor VIII inhibitors in patients with severe haemophilia A in southern Brazil. *Haemophilia* 15: 309-313.
- Lenting PJ, Neels JG, van der Berg BMM, Clijsters PPFM, Meijerman DWE, Pannekoek H, van Mourik JA, Mertens K, van Zonneveld AJ. 1999. The light chain of factor VIII comprises a binding site for low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 274: 23734-23739.
- Lenting PJ, van de Loo JWHP, Donath MJS, Mertens K. 1996. The sequence Glu(1811)-Lys(1818) of human blood coagulation factor VIII comprises a binding site for activated factor IX. *J Biol Chem* 271:1935-1940.
- Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. 1998. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood* 92: 3983-3996.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 16: 1215.
- Ngo JCK, Huang M, Roth DA, Furie BC, Furie B. 2008. Crystal structure of human factor VIII: implications for the formation of the factor IXa-factor VIIIa complex. *Structure* 16: 597-606.
- Oldenburg J, Pavlova A. 2006. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia* 12(Suppl. 6): 15–22.
- Petrey D, Honig B. 2003. GRASP2: visualization, surface properties, and electrostatics of macromolecular structures and sequences. *Meth Enzymol* 374:492-509.
- Saenko EL, Ananyeva N, Kouivskaia D, Schwinn H, Josic D, Shima M, Hauser CA, Pipe S. 2002. Molecular defects in coagulation factor VIII and their impact on factor VIII function. *Vox Sang* 83: 89–96.
- Saenko EL, Scandella D. 1997. The acidic region of the factor VIII light chain and the C2 domain together form the high affinity binding site for von Willebrand factor. *J Biol Chem* 272: 18007-18014.
- Takeshima K, Fujikawa K. 1999. The phospholipid binding property of the C2 domain of human factor VIII. *Thromb Haemost* 737(Suppl.): 234-235.
- Venkateswarlu D. 2010. Structural investigation of zymogenic and activated forms of human blood coagulation factor VIII: a computational molecular dynamics study. *BMC Struct Biol* 10: 7-27.

- Wakabayashi H, Schmidt KM, Fay PJ. 2002. Ca<sup>2+</sup> Binding to both the heavy and light chains of Factor VIII is required for cofactor activity. *Biochemistry* 41: 8485-8492.
- White GC, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J, Factor VIII and Factor IX Subcommittee. 2001. Definitions in hemophilia – Recommendation of the Scientific Subcommittee on Factor VIII and Factor IX of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 85(3):560.
- Worth CL, Preissner R, Blundell TL. 2011. SDM – a server for predicting effects of mutations on protein stability and malfunction. *Nucl Ac Res* 39(suppl 2): 215-232.

**Figure 1.** Missense mutations found in southern Brazilian patients. Mutations depicted in red are novel mutations and those depicted in light blue are previously described mutations. Yellow circles represent calcium ions and purple circles copper ions. Mutation D542G is located on a second low-affinity calcium ion bound that may contribute to inter-domain affinity, at the interface of A2 and A3 domains [Petrey and Honig, 2003; Venkateswarlu, 2010]. Mutation S109P, first described in this article, is located on the A1 domain, inside residues 108-124, which may contain a putative Ca<sup>+2</sup> site [Wakabayashi et al., 2002; Ngo *et al.*, 2008].

**Figure 2.** Effect of the L2297R mutation on FVIII electrostatic surface. On the left the FVIII molecule is represented, with its C2 domain in red. On the right, above the L2297 wild and below the R2297 mutated residues are shown. Note that in the mutated structure there is a pronounced positively charged area in the central region, absent in the wild structure. Blue, positive; red, negative; white, neutral charges. Charge values calculated vary between -5 (red) and +5 (blue) kiloteslas

**Table 1. Description of Mutations Detected in the Patients Included in this Study, and not Reported in HAMSTeRS**  
[\[https://hadb.org.uk/\]](https://hadb.org.uk/)

Mutation <sup>a</sup>	Amino acid substitution <sup>b</sup>	Mutation type	Exon	FVIII Domain	Inhibitors	Polyphen
c.284 T>C	p.I76T	Missense	3	A1	No	Probably damaging (0.99)
c.325 A>T	p.N90Y	Missense	3	A1	No	Probably damaging (0.99)
c.382 T>C	p.S109P	Missense	3	A1	No	Probably damaging (0.99)
c.586-587 ins TA	-	Small Insertion	4	A1	No	-
c.1235 G>T	p.W393L	Missense	8	A2	No	Probably damaging (1.00)
c.1703 del G	-	Small Deletion	11	A2	Yes	-
c.1596 G>A	p.W513X	Nonsense	11	A2	No	-
c.3151-3155 del ATATT	-	Small Deletion	14	B	Yes <sup>c</sup>	-
c.4936 del G	-	Small Deletion	14	B	Yes	-
c.5019 del T	-	Small Deletion	14	B	Yes	-
IVS15 + 1379insT	-	Small Insertion	IVS15	-	No/No	-
c.5626-32 del TCTGCC	-	Small Deletion	17	A3	No	Probably damaging (1.00)
c.5930 del T	-	Small Deletion	18	A3	Yes	-
c.6479-6484 ins	-	Small Insertion	23	C2	Yes	Possibly damaging (0.88)
c.6671 C>G	p.P2205R	Missense	24	C2	No	Probably damaging (1.00)
c.6947 T>G	p.L2297R	Missense	26	C2	Yes	Probably damaging (1.00)

<sup>a</sup>The mutation numbering was according to the complete mRNA sequence.

<sup>b</sup>The amino acid numbering given is for the mature processed protein, as adopted in HAMSTeRS.

<sup>c</sup>High titer

**Table 2. Description of Mutations Detected in the Patients Included in this Study, and Previously Listed in the HAMSTeRS Database [<https://hadb.org.uk/>] as Determining Hemophilia**

Nº of patients <sup>a</sup>	Mutation <sup>b</sup>	Amino acid substitution <sup>c</sup>	Mutation type	Exon	FVIII Domain	Inhibitors	Comparison with previous findings <sup>d</sup>
2	c.208-211 del TTGT	-	Small Deletion	2	A1	Yes/No	C
1	c.796 G>T	p.G247X	Nonsense	7	A1	Yes	D
1	c.1682A>G	p.D542G	Missense	11	A2	No	C
1	c.1703 G>T	p.G549V	Missense	11	A2	No	ND
1	c.2939-2945 insA	-	Small Insertion	14	B	No	C
3	c.1451 C>T	p.R795X	Nonsense	14	B	Yes/Yes/No	C
1	c.2485 G>T	p.E810X	Nonsense	14	B	No	C
1	c.3637 del A	-	Small Deletion	14	B	No	C
1	c.4379-4380 ins A	-	Small Insertion	14	B	Yes	D
1	c.6021 del G	-	Small Deletion	19	A3	No	D
2	c.6496 C>T	p.R2147X	Nonsense	23	C1	Yes/Yes <sup>e</sup>	C
1	c. 6976 C>T	p.R2307X	Nonsense	26	C2	No	C
1	Del exon 4-6	-	Large Deletion	multi	multi	Yes <sup>e</sup>	C

<sup>a</sup>Number of independent patients who presented the mutation.

<sup>b</sup>The mutation numbering was according to the complete mRNA sequence.

<sup>c</sup>The amino acid numbering given is for the mature processed protein, as adopted in HAMSTeRS.

<sup>d</sup>C: Confirmation; D: Discordance; ND: No data.

<sup>e</sup>High titer



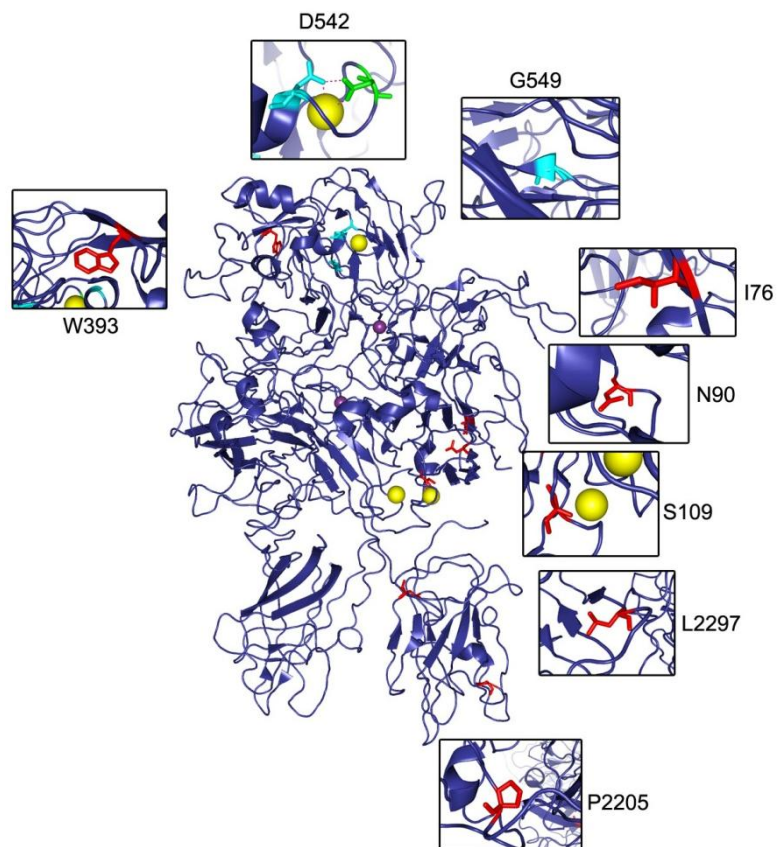


Figure 1

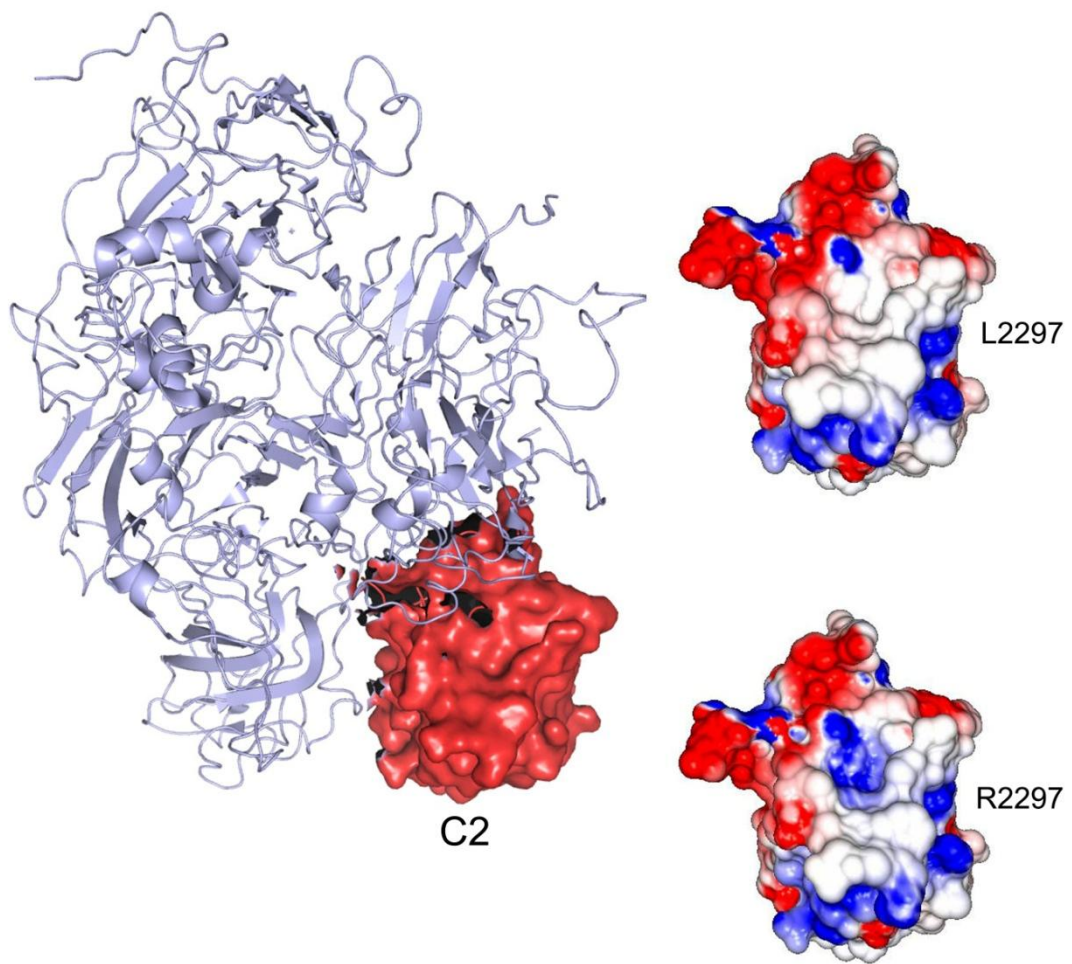


Figure 2

Desde a clonagem do gene do FVIII (Gitscheir *et al.*, 1984), as bases moleculares da hemofilia vêm sendo extensivamente estudadas. A disponibilidade das técnicas de biologia molecular acrescentou, ao diagnóstico laboratorial da hemofilia, a possibilidade de caracterizar a doença com um grau de detalhe muito mais aprofundado (Pio *et al.*, 2009).

Esse diagnóstico molecular é de grande importância na identificação de portadoras, em caso de mulheres com história familiar de hemofilia ou ainda em casos esporádicos. Ele permite o aconselhamento genético e a orientação familiar, possibilitando a participação e a decisão dos genitores sobre o planejamento de sua família. Os dados provenientes do diagnóstico molecular permitem o levantamento de dados quanto às características da doença, risco de recorrência e potenciais diagnósticos pré e pós-natal, bem como o suporte psicológico e emocional para a família (Miller *et al.*, 1999; Tagariello *et al.*, 2000; Pio *et al.*, 2009).

Quanto ao desfecho clínico da doença, estudos correlacionando o desenvolvimento de inibidores anti-FVIII e o tipo de mutação demonstraram que mutações com troca de aminoácidos e pequenas deleções estão relacionadas à baixa prevalência de inibidores. Em contraste, mutações sem sentido, grandes deleções e as inversões dos íntrons 1 e 22 se associam a uma maior prevalência de inibidores (Schwaab *et al.*, 1995; Oldenburg and Pavlova, 2006). A informação sobre o tipo de mutação pode, no futuro, influenciar na terapia do paciente, visando à prevenção de complicações do tratamento. Os dados de nosso estudo corroboram estudos anteriores, sugerindo um maior risco de desenvolvimento de inibidores em pacientes com grandes deleções, mutações sem sentido e pequenas deleções/inserções do que em pacientes com mutações de sentido trocado.

O diagnóstico molecular permite, ainda, uma melhor compreensão da relação estrutural-funcional da doença. Em nosso trabalho, foram encontradas, entre outras mutações de efeito evidente, duas mutações (D542G e S109P) que podem interferir em sítios de ligação ao cálcio, uma mutação (P2205R) que pode ser prejudicial à interação entre o FVIII e o FvW e uma mutação (L2297R), que altera a superfície

eletrostática da proteína. Esses dados contribuem para o melhor entendimento da funcionalidade e da estrutura do FVIII.

Porém, apesar do grande volume de informações sobre as bases moleculares da hemofilia A, existe um percentual de cerca de 2-3% dos pacientes cujo diagnóstico molecular não é estabelecido, mesmo usando as abordagens mais avançadas para a análise do gene (Klopp *et al.*, 2002; Pio *et al.*, 2009). Isto pode ser decorrente de mutações que estão presentes em regiões não codificadoras, na região promotora ou no RNA mensageiro; um possível mecanismo inclui a ausência ou a transcrição incorreta, devido a mudanças em regiões no gene do FVIII que não são normalmente investigadas para mutações. A presença de rearranjos macroestruturais, como duplicações e inversões, são frequentemente difíceis de identificar usando o sequenciamento. Uma possibilidade adicional é o envolvimento de outros loci, os quais podem interagir de alguma forma com o gene ou a proteína FVIII, resultando em baixos níveis de atividade da mesma (Halldén *et al.*, 2012). Um exemplo dessa condição é a deficiência combinada de fator V e fator VIII da coagulação; alterações nos genes LMAN1 (*lectin mannose binding 1*) e MCFD2 (*multiple coagulation factor deficiency 2 protein*), responsáveis pelo transporte intracelular do FVIII do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi, podem resultar nessa deficiência (Zhang & Ginsburg, 2004). É também interessante pensar que alterações nas proteínas da coagulação que interagem diretamente com o FVIII (FvW, FII, FIX, FX) podem influenciar na quantidade e na funcionalidade do FVIII.

Em nosso trabalho, a frequência de pacientes sem mutação identificada foi de 30%, sendo maior do que a esperada. Para a identificação da alteração genética nesses pacientes, seriam necessárias novas abordagens para testar as hipóteses citadas. É necessário também avaliar a relação de parentesco desconhecida pelos próprios indivíduos, o que implicaria no aparecimento de uma mesma alteração em mais de um desses pacientes. Para descartar essa hipótese, Halldén *et al.* utilizaram em seu trabalho 18 marcadores polimórficos de troca única de nucleotídeos (SNPs) e 5 marcadores microssatélites do gene do FVIII, bem como um conjunto de 32 SNPs flanqueando o mesmo.

O presente trabalho insere-se dentro de um projeto de longa duração sobre os fatores que influenciam a hemostasia, e que foi iniciado há meio século por Israel Roisenberg (conferir Roisenberg, 1968). Ao longo desses anos foram desenvolvidos

diversos trabalhos de investigação que envolveram não somente as hemofilias como também a doença de von Willebrand e aspectos diversos da trombofilia. Essas pesquisas foram sempre acompanhadas por importante atividade de extensão, com o fornecimento de diagnósticos de baixo custo (cobertura apenas do preço dos reagentes), aconselhamento genético, e apoio às entidades que congregam hemofílicos no Brasil. Desta maneira procura-se colocar na prática o princípio de que a ciência deve, sempre que possível, contribuir para o bem-estar social da humanidade.

## CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

---

Novas tecnologias na biologia molecular têm aumentado muito o conhecimento sobre a origem da hemofilia A e a fisiologia do FVIII. Uma grande variedade de diferentes mutações no gene do FVIII tem sido identificada e seus efeitos na proteína têm sido descritos. O ciclo de vida do FVIII e sua relação estrutural-funcional estão sendo continuamente esclarecidos. Este trabalho colaborou para essa constante construção de conhecimento, tendo demonstrado 16 novas mutações no gene do FVIII - relacionadas à hemofilia A grave – e seus prováveis efeitos.

Como perspectivas da continuidade desse trabalho podem-se mencionar o uso de novas abordagens a fim de esclarecer a causa da doença em pacientes sem mutações nos éxons, o aumento no número de indivíduos estudados para uma análise da relação entre mutação e desenvolvimento de inibidores e ainda o estudo funcional das mutações novas encontradas. Concomitantemente, e isso já está sendo feito por nosso grupo, pode-se investigar as bases moleculares da patologia em pacientes com hemofilia moderada ou leve.

## Referências Bibliográficas

- Abu-Amero KK, Hellani A, Al-Mahed M, Al-Sheikh I (2008). Spectrum of factor VIII mutations in Arab patients with severe haemophilia A. *Haemophilia*, 14: 484-488.
- Agostini D, Rosset C, Botton MR, Kappel DB, Vieira IA, Gorziza RP, Salzano FM, Bandinelli E (2012). Immune system polymorphisms and Factor VIII inhibitor formation in Brazilian haemophilia A severe patients (submitted).
- Ahmed RPH, Ivaskevicius V, Kannan M, Seifred E, Oldenburg J, Saxena R (2005). Identification of 32 novel mutations on the factor VIII gene in Indian patients with haemophilia A. *Haematologica*, 90: 283-284.
- Albanez S, Ruiz-Saez A, Boadas A, Bosch N, Porco A (2011). Identification of factor VIII gene mutations in patients with severe haemophilia A in Venezuela: identification of seven novel mutations. *Haemophilia*, 17: e913-8.
- Aledort LM, Dimichele DM (1998). Inhibitors occur more frequently in African-American and Latino haemophiliacs. *Haemophilia*, 4: 68.
- Alexandre CO, Roisenberg I (1985). A genetic and demographic study of hemophilia A in Brazil. *Hum Hered*, 35: 250-254.
- Andrikovics H, Klein I, Bors A, Nemes L, Marosi A, Varadi A, Tordai A (2003). Analysis of large structural changes of factor VIII gene involving intron 1 and 22, in severe haemophilia A. *J Haematol*, 88: 778-784.
- Antonarakis SS, Consortium of 65 international authors (1995). Factor VIII gene inversions in severe haemophilia A – results of an international consortium study. *Blood*, 86: 2206-2212.

- Arruda VR, Pieneman WC, Reitsma PH, Deutz-Terlouw PP, Annichino-Bizzacchi JM, Briet E, Costa FF (1995). Eleven novel mutations in the Factor VIII gene from Brazilian hemophilia A patients. *Blood*, 86: 3015-3020.
- Astermark J, Oldenburg J, Escobar M, White GC, Berntorp E (2005). Genetic defects of inhibitor development in siblings with severe haemophilia A. *Haematologica*, 90: 424-430.
- Astermark J, Oldenburg J, Carlson J (2006a). Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood*, 108: 3739-3745.
- Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, Lefvert AK (2006b). Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood*, 107: 3167-3172.
- Astermark J, Wang X, Oldenburg J, Berntorp E, Lefvert AK (2007). Polymorphisms in the CTLA-4 gene and inhibitor development in patients with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost*, 5: 263-265.
- Awidi A, Ramahi M, Alhattab D, Mefleh R, Dweiri M, Bsoul N et al. (2010). Study of mutations in Jordanian patients with haemophilia A: identification of five novel mutations. *Haemophilia*, 16: 136-142.
- Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F (2002). Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood*, 99: 168–174.
- Becker R (2005). Cells based model for coagulation: a paradigm on evolution. *J Thromb Haemost*, 20: 65-68.



- Boeckhorst J, Verbruggen B, Lavergne JM, Costa JM, Schoormans CM, Brons PT et al. (2005). Thirteen novel mutations in the factor VIII gene in the Nijmegen haemophilia A patient population. *Brit J of Haematol*, 131: 109-117.
- Bolton-Maggs PHB & Pasi JK (2003). Haemophilias A and B. *Lancet*, 361: 1801-1809.
- Carlsson KS, Astermark J, Donfield S, Berntorp E (2008). Cost and outcome: comparison of two alternative bypassing agents for persons with haemophilia A complicated by an inhibitor. *Thromb Haemost*, 99: 1060-1067.
- Casãna P, Cabrera N, Cid AR, Haya S, Beneyto M, Espinós C et al. (2008). Severe and moderate haemophilia A: identification of 38 new genetic alterations. *Haematologica*, 90: 707-710.
- Castaman G, Giacomelli SH, Ghiotto R, Boseggia C, Pojani K, Bullo A et al. (2007). Spectrum of mutations in Albanian patients with haemophilia A: identification of ten novel mutations in the factor gene. *Haemophilia*, 13: 311-316.
- Chen YC, Hu SH, Cheng SN, Chao TY (2010). Genetic analysis of haemophilia A in Taiwan. *Haemophilia*, 16: 1-7.
- Chi Ki Ngo J, Huang M, Roth D, Furie BC, Furie B (2008). Crystal Structure of Human Factor VIII: Implications for the Formation of the Factor IXa-Factor VIIIa Complex. *Structure*, 16: 597–606.
- Chur-Woo Y, Hee-Sook H, Hee-Jin K, Eui-Jeon W, Soon-Ae K, Haing-Woon B (2010). Mutation analysis of factor VIII in Korean patients with severe hemophilia A. *Int J Hematol*, 91:784–791.
- Cruillet B, Lambert T, d'Oiran R, Proulle V, Plantier JL, Rafowics A et al. (2006). Detection of 95 novel mutations in coagulation Factor VIII gene F8 responsible for haemophilia A: results from a single institution. *Hum Mut*, 27: 676-685

- David D, Ventura C, Moreira I, Diniz MJ, Antunes M, Tavares A et al. (2006). The spectrum of mutations and molecular pathogenesis of haemophilia A in 181 Portuguese patients. *Haematologica*, 91: 840-843.
- Davie EW and Ratnoff OD (1964). Watterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*, 145: 1310-1312.
- Fang H, Wang L, Wang H (2006). The protein structure and effect of factor VIII. *Thromb Reserch*, 119: 1-13.
- Fay PJ, Chavin SI, Schroeder D, Young FE, Marder VJ (1982). Purification and characterization of a highly purified human factor VIII consisting of a single type of polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79: 7200-7204.
- Fay PJ (2004). Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. *Blood Reviews*, 18: 1–15.
- Fay PJ, Scandella D (1999). Human inhibitor antibodies specific for the factor VIII A2 domain disrupt the interaction between the subunit and factor IXa. *J Biol Chem*: 274: 29826–29830.
- Fernandez-Lopez O, Garcia-Lozano JR, Nunez-Vasquez R, Pérez-Garrido R, Núñez-Roldan A (2005). The spectrum of mutations in southern Spanish patients with haemophilia A and identification of 28 novel mutations. *Haematologica*, 90: 707-710.
- Figueiredo MS, Tavella MH, Simões BP (1994). Large DNA inversions, deletions and TaqI site mutations in severe haemophilia A. *Hum Genet*, 94: 473-478.
- Ghosh K, Shetty S (2009). Immune response to FVIII in hemophilia A: an overview of risk factors. *Clinl Rev Allergy Immunol*, 37: 58–66.

- Gilbert MS (1981). Haemophilic arthropathy: an overview. In: Selingsohn U, Rimon A, Horoszowski H (eds). Haemophilia. 2 ed. Alan R. Liss, New York, pp. 157-162.
- Gitscheir J, Wood WI, Goralka TM (1984). Characterization of the human factor VIII gene. *Nature*, 312: 326-330.
- Goudemand J (1999). Hemophilia treatment of patients with inhibitors: cost issues. *Haemophilia*, 5:397-401.
- Gouw SC, Van der Bom JG, Van der Berg HM, Zewald RA, Ploos Van Amstel JK, Mauser-Bunschoten EP (2010). Influence of the type of F8 gene mutation on inhibitor development in a single centre cohort of severe haemophilia A patients. *Haemophilia*, 17: 275-281.
- Green PM, Bagnall RD, Waseem NH, Gianelli F (2008). Haemophilia A mutations in the UK: results of screening one-third of the population. *Brit J Haematol*, 143: 115-128.
- Halldén C, Knobe KE, Sjörin E, Nilsson D, Ljung R (2012). Investigation of disease-associated factors in haemophilia A patients without detectable mutations. *Haemophilia*, Jan 4 [epub ahead of print].
- HAMSTeRS - The Haemophilia A Mutation, Structure, Test And Resource Site. <http://Europium.Csc.Mrc.Ac.Uk/Webpages/Main/Main.htm>. Acesso em janeiro/2012.
- Hill M, Deam S, Gordon B, Dolan G (2005). Mutation analysis in 51 patients with haemophilia A: report of 10 novel mutations and correlations between genotype and clinical phenotype. *Haemophilia*, 11: 133-141.
- Hoffman M, Monroe DM (2001). A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*, 85: 958-965.

- Hoffman M (2003). A cell-based model and the role of FVIIa. *Blood Reviews*, 17: 51-55.
- Hoyer LW (1994). Haemophilia A. *N Engl J Med*, 330: 38-47.
- Hoyer LW (1995). The incidence of factor VIII inhibitors in patients with severe haemophilia A. In: Aledort LM, Hoyer LW, Lusher JM, Reisner HM, White GC (eds) *Inhibitors to coagulation factors*. Plenum, Chapel Hill, pp 35-46.
- Hua BL, Yan Z, Liang Y, Yan M, Fan LK, Li KX, Xiao B (2010). Identification of seven novel mutations in the factor VIII gene in 18 unrelated Chinese patients with haemophilia A. *Chin Med J*, 123: 305-310.
- Hwang SH, Kim MJ, Lim JA, Kim HC, Kim HS (2009). Profiling of Factor VIII mutations in Korean haemophilia A. *Haemophilia*, 15: 1311-1317.
- Kasper CK, Lin JC (2007). Prevalence of sporadic and familial haemophilia. *Haemophilia*, 13: 90–92.
- Kempton CL & White GC (2009). How we treat a hemophilia A patient with a factor VIII inhibitor. *Blood*, 113: 11-17.
- Klopp N, Oldenburg J, Uen C, Schneppenheim R, Graw J (2002). 11 hemophilia A patients without mutations in the factor VIII encoding gene. *Thromb Haemost.*, 88: 357-360.
- Koeppen BM & Stanton BA. Hemostasia e Coagulação do Sangue. In: Berne e Levy (1996). *Fisiologia*. Guanabara Koogan, São Paulo, pp 321-338.
- Lacroix-Desmazes S, Moreau A, Sooryanarayana, Bonnemain C, Stieltjes N, Pashov A et al. (1999). Catalytic activity of antibodies against factor VIII in patients with hemophilia A. *Nature Med*, 5: 1044–1047.

- Lappan KA, Fay PJ (1998). Interaction of the A1 subunit of factor VIII and the serine protease domain of factor X identified by zero-length cross-linking. *Thromb Haemost*, 80: 418-422.
- Laurie AD, Sheen CR, Hanrahan V, Smith MP, George PM (2007). The molecular aetiology of haemophilia A in a New Zealand patient group. *Haemophilia*, 13: 420-427.
- Leiria LB, Roisenberg I, Salzano FM, Bandinelli E (2009). Introns 1 and 22 inversions and factor VIII inhibitors in patients with severe haemophilia A in southern Brazil. *Haemophilia*, 15: 309-313.
- Lenting PJ, van de Loo JWHP, Donath MJSH, Mertens K (1996). The sequence Glu(1811)-Lys(1818) of human blood coagulation factor VIII comprises a binding site for activated factor IX. *J Biol Chem*, 271:1935-1940.
- Lenting PJ, Van Mourik Ja, Mertens K (1998). The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood*, 92: 3983-3996.
- Lenting PJ, Neels JG, van der Berg BMM, Clijsters PPFM, Meijerman DWE, Pannekoek, et al (1999). The light chain of factor VIII comprises a binding site for low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem*, 274: 23734-23739.
- Marcus AJ & Safier LB (1993). Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB*, 7: 516-522.
- Miller R (1999). Counseling about diagnosis and inheritance of genetic bleeding disorders: Haemophilia A and B. *Hemophilia*, 5:77-83.
- Molinas F & Bozzini CE. Hemostasia. In: Cingolani, HE (2004). *Fisiologia Humana de Houssay*. Artmed, Porto Alegre, pp 148-158.

- Moran TA & Viele CS (2005). Normal Clotting. *Semin Oncol Nurs*, 21: 1-11.
- Nair PS, Shetty S, Kulkarni B, Ghosh K (2010). Molecular pathology of haemophilia A in Indian Patients: Identification of 11 novel mutations. *Clin Chim Acta*, 411: 2004-2008.
- Nilsson IM, Lamme S (1993) On acquired haemophilia A - a survey of 11 cases. *Acta Med Scand*, 208: 5-12.
- Oldenburg J, Pavlova A (2006). Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia*, 12: 15-22.
- Oldenburg J, Dolan G, Lemm G (2009). Haemophilia care then, now and the future. *Haemophilia*, 15: 2-7.
- Ozello MC, Villaça PR, Almeida JOS, Bueno TMF, Miranda PAP, Hart WM et al. (2007). A cost evaluation of treatment alternative for mild-to-moderate bleeding episodes in patients with haemophilia and inhibitors in Brazil. *Haemophilia*, 13: 462-469.
- Pio SF, Oliveira GC, Rezende SM (2009). As bases moleculares da hemofilia A. *Rev Assoc Med Bras*, 55: 213-219.
- Pipe SW (2009). Functional roles of the factor VIII B domain. *Haemophilia*, 15:1187-1196.
- Poggi H, Honorato J, Romeo E, Zuñica P, Quiroga T, Lagos M (2011). Análisis de las inversiones del intrón 1 y 22 y secuenciación del gen F8 para el diagnóstico genético-molecular. *Rev Med Chile*, 139: 189-196.

- Ragni MV, Ojeifo O, Feng J, Yan J, Hill KA, Sommer SS et al. (2009). Risk factors for inhibitor formation in haemophilia: a prevalent case–control study. *Haemophilia*, 15: 1074–1082.
- Ravanbod S, Rassoulzadegan M, Rastegar-Lari G, Jazebi M, Enayat S, Ala F (2011). Identification of 123 previously unreported mutations in the F8 gene of Iranian patients with Haemophilia A. *Haemophilia*, Nov 28 [epub ahead of print].
- Reipert BM, Pauline MW, Heldem VD, Schwarz HP, Hausl C (2006). Mechanisms of action of immune tolerance induction against factor VIII in patients with congenital haemophilia A and factor VIII inhibitors. *Brit J Haematol*, 136: 12–25.
- Reitter S, Sturn R, Horvart B, Freitag R, Male C, Muntean W et al. (2010). Spectrum of causative mutations in patients with haemophilia A in Austria. *Blood Coag, Fibrinol and Cell Haemost*, 104: 78-85.
- Repsc e Y, Slaoni M, Fernandez D, Crautier P, Costa C, Costa JM et al. (2007). Factor VIII (FVIII) gene mutations in 120 patients with haemophilia A: detection of 26 novel mutations and correlation with FVIII inhibitor development. *J Thromb Haemost*, 5: 1469-1476.
- Rezende SM, Pinheiro K, Caram C, Genovez G, Barca D (2009). Registry of inherited coagulopathies in Brazil: first report. *Haemophilia*, 15: 142–149.
- Riccardi F, Tagliaferri A, Martorana D, Rivolta GF, Valdre L, Rodorigo G et al. (2010). Spectrum of F8 gene mutations in haemophilia A patients from a region of Italy: identification of 23 novel mutations. *Haemophilia*, 16: 791-800.
- Rieger A (1996). Aspectos genéticos e epidemiológicos dos inibidores na hemofilia A. Disserta o de Mestrado – Programa de Pós Gradua o em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

- Rieger A & Roisenberg I (1999). Prevalence of factor VIII inhibitors in patients with haemophilia A in Brazil. *Thromb Haemost* 81: 475-476.
- Roisenberg, I. (1968). Hemofilia e estados hemofilióides no Rio Grande do Sul. Freqüência, fisiologia e herança. Tese de Doutorado, Faculdade de Filosofia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Rosseti LC, Radic CP, Candela M, Bianco RP, Pinto MT, Godeve A, Larripa IB, de Brasi CD (2007). Sixteen novel haemophilia A causative mutations in the first Argentinian series of severe molecular defect. *Haematologica*, 92: 842-845.
- Saenko EL, Ananyeva N, Kouivskaia D, Schwinn H, Josic D, Shima M et al. (2002). Molecular defects in coagulation factor VIII and their impact on factor VIII function. *Vox Sang*, 83: 89–96.
- Salviato R, Belvini D, Rodossi P, Sartori R, Pierobon F, Zanotto D et al. (2007). F8 gene mutation profile and ITT response in a cohort of Italian haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia*, 13: 361-372.
- Santiagostino E, Mancuso ME, Rosino A, Mancuso G, Mazzuconi MG, Tagliaferri A, Messina M, Mannuci PM (2005). Environmental risk factors for inhibitor development in children with haemophilia A: a case-control study. *Brit J Haematol*, 130: 422-427.
- Santacroce R, Santaro R, Sessa F, Iannaccaro P, Sarno M, Largo V et al. (2008). Screening of mutations of haemophilia A in 40 Italian patients: a novel G-to-A mutation in intron 10 of the F8 gene as a putative cause of mild haemophilia in southern Italy. *Blood Coagul Fibrinol*, 19: 197-202.
- Scandella D, Marttingly M, Prescott R (1993). A recombinant factor VIII domain polypeptide quantitatively neutralizes human inhibitor antibodies that bind to A2. *Blood*, 82:1767-1775.



- Schenone M, Furie BC, Furie B (2004). The blood coagulation cascade. *Curr Opin Hematol*, 11: 272-277.
- Schwaab R, Brackmann HH, Meyer C et al. (1995). Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. *Thromb Haemost*, 74: 1402–1406.
- Silva-Pinto S, Fidalgo T, Salvado R, Marques D, Gonçalves E, et al. (2012). Molecular diagnosis of haemophilia A at Centro Hospitalar de Coimbra in Portugal: study of 103 families – 15 new mutations. *Haemophilia*, 18: 129-138.
- Soares RPS, Charmone DAF, Bydlowski SP (2001). Factor VIII gene inversions and polymorphisms in Brazilian patients with haemophilia A: carrier detection and prenatal diagnosis. *Haemophilia*, 7: 299-305.
- Stassen JM, Arnout J, Deckmyn H (2004). The hemostatic system. *Curr Med Chem*, 11: 2245-2260.
- Tagariello G, Belvoni D, Salviato R, Are A, De Biasi E, Goodeve A, et al. (2000). Experience of a single Italian center in genetic counseling for hemophilia: from linkage analysis to molecular diagnosis. *Haematologica*, 85: 525-529.
- Takeshima K, Fujikawa K (1999). The phospholipid binding property of the C2 domain of human factor VIII. *Thromb Haemost*, 737: 234-235.
- Terraube V, Donnel JSO, Jenkins PV (2010). Factor VIII and von Willebrand factor interaction: biological, clinical and therapeutic importance. *Haemophilia*, 16: 3–13.
- Toole JJ, Knofl JL, Wozney JM, Sultzman LA, Buecker JL, Pittman DD et al. (1984). Molecular cloning of cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature*, 312: 342-347.

- Tuddenham EGD & Cooper DN (1994). FVIII and Hemophilia A. Oxford Monog Med Genet, 25: 19-76.
- Van den Berg HM, Chalmers EA (2009). Clinical prediction models for inhibitor development in severe hemophilia A. J Thromb Haemost, 7: 98–102.
- Vehar GA, Key B, Eaton D, Rodriguez H, O'Brien DP, Hotblat F, et al. (1984). Structure of human FVIII. Nature, 312: 337-342.
- Veiga MTA, Montalvão SAL, Rezende SM (2008). Hemofilia congênita e inibidor: manual de diagnóstico e tratamento de eventos hemorrágicos. Ministério da Saúde do Brasil, Brasília.
- Venceslá A, Corral-Rodríguez MA, Baena M, Cornet M, Domenech M, Baiget M et al. (2008). Identification of 31 novel mutations in the F8 in Spanish haemophilia A patients: structural analysis of 20 missense mutations suggests new intermolecular binding sites. Blood, 111: 3468-3478.
- Venkateswarlu D (2010). Structural investigation of zymogenic and activated forms of human blood coagulation factor VIII: a computational molecular dynamics study. BMC Struct Biol; 10: 7-27.
- Vinciguerra C, Zawadzki C, Dargaud Y, Pernod G, Berger C, Nougier C, Négrier C (2006). Characterization of 96 mutations in 128 unrelated severe haemophilia A patients from France. Thromb Haemost, 95: 593-598.
- Wakabayashi H, Schmidt KM, Fay PJ (2002). Ca<sup>2+</sup> Binding to Both the Heavy and Light Chains of Factor VIII Is Required for Cofactor Activity. Biochem 2002, 41: 8485-8492.
- White GC II, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J, Factor VIII and factor IX Subcommittee, Definitions in hemophilia (2001). 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.

Wion KL, Kelly D, Summerfield JA, Teddenham EGD, Lawn RM (1985). Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature*, 317: 716-729.

Zhang B, Ginsburg D (2004). Familial multiple coagulation factor deficiencies: new biologic insight from rare genetic bleeding disorders. *J Thromb Haemost.*, 2: 1564-1572.