

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

**ESTUDO DE DUAS INVERSÕES (INV1 E INV22) NO GENE DO FATOR VIII E O  
DESENVOLVIMENTO DE INIBIDORES CONTRA O FVIII EM HEMOFÍLICOS A  
DO TIPO GRAVE NO RIO GRANDE DO SUL.**

**LEONARDO BARBOSA LEIRIA**

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

**Orientador: Francisco M. Salzano**

**Co-orientador: Israel Roisenberg**

**Colaboradora: Eliane Bandinelli**

**Porto Alegre, Março de 2008.**

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

As fontes financiadoras desse estudo foram a Financiadora de Estudos e Projetos (FAURGS-FINEP), o Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## **Agradecimentos**

Ao professor Israel por todo apoio, auxílio e valorosos ensinamentos para a minha formação pessoal e profissional, bem como pela confiança depositada em mim ao longo do tempo.

Ao professor Salzano por suas contribuições e por aceitar me orientar no último ano de mestrado.

À professora Eliane pelo convívio e pela contribuição na minha formação acadêmica ao longo desses anos.

À professora Sídia por me auxiliar nas análises estatísticas do estudo e pelo convívio.

À professora Lavínia e ao seu grupo por todo auxílio e convívio.

À Daisy e a Kátia por serem meus exemplos de profissionalismo ao longo da minha caminhada acadêmica e pelo convívio no laboratório.

À Ana Maria por me auxiliar na parte técnica das dosagens de fator VIII e inibidores e pelo convívio nesses anos.

Aos doutores Mauro e Kozue e demais profissionais do Instituto Fleury por me auxiliarem no início desse trabalho.

À professora Mara e ao seu grupo pelo convívio e por permitirem e me ajudarem na quantificação das amostras.

Aos integrantes, ex-integrantes e agregados do Laboratório de Hemostasia pelo convívio durante o mestrado e antes disso.

Aos professores do Departamento de Genética da UFGRS, que muito contribuíram para a minha formação nesses anos.

Ao Elmo e à Elen por toda ajuda dada durante o mestrado.

Aos meus familiares pelo total apoio e auxílio em todos os momentos durante essa caminhada.

Aos meus amigos pelas valorosas contribuições pessoais e profissionais.

À Gisele por toda atenção, carinho, apoio, preocupação e dedicação.

E a todos que de alguma forma contribuíram para esse trabalho.

## **Apresentação**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Hemostasia do Departamento de Genética dessa universidade, sob a orientação dos professores Israel Roisenberg e Francisco Mauro Salzano e supervisionado pela professora Eliane Bandinelli. O trabalho desenvolvido ao longo desses dois anos de Mestrado foi dividido em dois grandes grupos (Capítulos 2 e 3).

O Capítulo 2 informa a frequência de duas inversões (Inv1 e Inv22) na população de hemofílicos A graves do Rio Grande do Sul e a comparação com outras populações mundiais, já o Capítulo 3 aborda a relação dessas inversões e de outras condições com o desenvolvimento de inibidores contra o Fator VIII. Dados complementares dos dois capítulos se encontram no Apêndice dessa Dissertação.

## Sumário

	Páginas
Lista de Abreviaturas.....	7
Lista de Figuras e Tabelas .....	8
Resumo .....	9
Abstract.....	11
Capítulo 1. Introdução e Objetivos.....	13
1. Introdução.....	13
1.1. A Hemostasia.....	13
1.1.1. A Via Clássica da Cascata de Coagulação .....	15
1.1.2. A Via Celular-Enzimática da Cascata de Coagulação.....	18
1.1.3. O Fator VIII (FVIII) .....	22
1.1.4. O Gene e a Estrutura do FVIII.....	24
1.2. As Hemofilias .....	29
1.2.1. A Hemofilia A .....	29
1.2.2. Sintomatologia e Classificação dos Hemofílicos do tipo A .....	30
1.2.2.1. O Tratamento de Pacientes com Hemofilia A .....	31
1.2.2.2. As Mutações no Gene do FVIII e a hemofilia A.....	31
1.2.2.3. A Inversão do Intron 1 (Inv1).....	33
1.2.2.4. A Inversão do Intron 22 (Inv22).....	35
1.3. O Desenvolvimento de Inibidores Contra o FVIII .....	39
2. Objetivos.....	43
2.1. Objetivo Geral .....	43
2.2. Objetivos Específicos .....	43
Capítulo 2. Introns 1 and 22 inversions and factors VIII inhibitors in patients with severe hemophilia A in southern Brazil.....	44
Capítulo 3. História natural de uma população de hemofílicos A graves do sul do Brasil, com ênfase no desenvolvimento de inibidores do Fator VIII.....	59
Discussão.....	78
Conclusão Final e Perspectivas .....	83
Referências Bibliográficas.....	84
Apêndices .....	94
Apêndice 1. Seguimento.....	95
Apêndice 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	96
Apêndice 3. Ficha Clínica dos Pacientes.....	98

## **Lista de Abreviaturas**

CRIO: Crioprecipitado (derivado de plasma precipitado)

FVIII: Fator VIII da coagulação

FvW: Fator von Willebrand

HA: Hemofilia do tipo A

INV1: Inversão do intron 1

INV22: Inversão do intron 22

I-PCR: PCR inverso

PAI: Inibidores de Ativadores do Plasminogênio

TF: Fator tecidual (*tissue factor*)

T-PA: Ativador de plasminogênio do tipo tissular

U-PA: Ativador de plasminogênio do tipo uroquinase

## Lista de Figuras e Tabelas da Introdução

Figuras:	Página
Fig. 1. A via clássica da cascata da coagulação sanguínea .....	7
Fig. 2. Modelo via celular-enzimática da cascata da coagulação sanguínea .....	21
Fig. 3. Estrutura molecular do fVIII .....	23
Fig. 4. Organização física do gene do fVIII humano .....	26
Fig. 5. Domínios estruturais de ativação do fVIII .....	28
Fig. 6. Mecanismo hipotético de formação da Inv1 .....	34
Fig. 7. Mecanismo hipotético de formação da inv22 .....	38
Fig. 8. Fatores de risco associados com o desenvolvimento de resposta imune contra o FVIII em hemofilia A .....	42
Tabelas:	
Tabela 1. Organização do gene do fVIII humano .....	27



## **Resumo**

**Introdução:** A Hemofilia A (HA) é a doença hemorrágica ligada ao X mais freqüente na população mundial, causada por alterações no fator VIII (FVIII), afetando 1:5000 nascimentos masculinos. A forma grave dessa doença é encontrada em 50% dos pacientes e é caracterizada por intensos episódios hemorrágicos. O principal problema no tratamento desses pacientes é o desenvolvimento de anticorpos que neutralizam o FVIII infundido, chamados de inibidores contra o FVIII. Alterações estruturais no gene do fator VIII são possíveis fatores de risco ao desenvolvimento de inibidores. Duas inversões (Inv1 e Inv22) são as mais freqüentes e ocorrem exclusivamente em famílias de pacientes com HA grave, afetando cerca de 50% das famílias. Outros fatores genéticos e ambientais estão descritos na literatura como candidatos a fatores de risco ou associados com a produção de anticorpos contra o FVIII.

**Objetivos:** Estabelecer as freqüências dessas inversões em hemofílicos graves do Rio Grande do Sul e verificar a associação entre o desenvolvimento dos inibidores e a presença das inversões nos pacientes, bem como estudar outros fatores relacionados ao surgimento dos inibidores.

**Metodologia:** Foram entrevistadas e estudadas 158 famílias não aparentadas, representadas por 229 pacientes com hemofilia A graves (<1% FVIII) provenientes dos centros de hemoterapia do Rio Grande do Sul (Hemocentro-RS) que aceitaram livremente participar desse estudo. A partir disso, os pacientes foram genotipados para as duas inversões. Desses, foram dosados inibidores de 136 famílias (168 pacientes). **Resultados:** As freqüências das inversões do intron 1 e 22 nas famílias foram de aproximadamente 4% e 45%, respectivamente, estando essas de acordo com as freqüências de outras populações mundiais. Não foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre o surgimento de

inibidores e a presença das inversões nos pacientes. Outros possíveis fatores de risco como tipo de tratamento, a etnia e a idade dos pacientes, a dose administrada de FVIII, a duração do tratamento e a presença de infecções virais crônicas foram também estudados. Quando analisados em separado, o tempo de uso de FVIII, a utilização de crioprecipitado, a dose do fator e a idade dos pacientes estão associados com desenvolvimento de inibidores, porém quando analisados em conjunto em um modelo preditor da formação de inibidores esse modelo fornece resultados não significativos.

**Conclusões:** Esse estudo constitui-se em uma primeira aproximação ao problema, que é complexo; a continuação das pesquisas, agora envolvendo também fatores específicos do sistema imune dos pacientes, poderá fornecer dados mais conclusivos.

## **Abstract**

**Introduction:** Hemophilia A (HA) is the most common sex-linked bleeding disorder caused by genetic changes in factor VIII, affecting 1:5000 male births. Severe HA is the most frequent form and occur in 50% of the patients and is characterized by intense hemorrhagic episodes. The main problem in the treatment of these patients is the development of FVIII antibodies that neutralize the infused FVIII, called FVIII inhibitors. Structural alterations in the factor VIII gene are possible risk factors for the development of inhibitors. Two inversions (Inv1 and Inv22) are the most frequent and they occur exclusively in patients of families with severe HA, affecting about 50% of the families. Other genetic and environmental factors are described in the literature as candidates to risk factors or as being associated with the production of FVIII antibodies.

**Objectives:** To establish the frequencies of these inversions in Rio Grande do Sul and to verify the association between the development of the inhibitors and the presence of the inversions in the patients, as well as to study other factors related to the appearance of the inhibitors.

**Patients and Methods:** The study was carried out on 158 unrelated families, represented by 229 patients with severe HA (<1% FVIII) ascertained from Rio Grande do Sul's centers of hemotherapy (Hemocentro-RS) that freely accepted to participate in the investigation. The patients were genotyped for the two inversions, and their inhibitor levels tested in 136 families (168 patients).

**Results:** Intron 1 and 22 inversion frequencies were approximately 4% and 45%, in agreement with those reported for other world populations. No statistically significant association between the occurrence of inhibitors and the presence of these inversions in the

patients was found. Other possible risk factors as the type of treatment, ethnic group, patients' age, administered FVIII dose, duration of treatment and the presence of chronic viral infections were also studied. When separately analyzed, duration of FVIII, treatment, cryoprecipitate use, the factor dose and the patients' age are associated with inhibitor development, but when analyzed together in a model of inhibitors formation prediction the model yields non-significant results.

**Conclusions:** This study is a first approximation to this complex problem; the continuation of the research, now involving also specific factors of the patient's immune system, could furnish more conclusive data.

## **Capítulo 1. Introdução e Objetivos**

### **1. Introdução**

Desde as civilizações mais remotas, os seres humanos vêm buscando conhecer mais sobre os mecanismos e os princípios que envolvem a hemostasia e as doenças ocasionadas devido ao seu desequilíbrio, sobretudo, as doenças hemorrágicas.

Mesmo sendo uma das patologias mais antigas já descritas, muitos mecanismos e peculiaridades que envolvem as doenças hemorrágicas ainda não estão bem esclarecidos. Além disso, ainda hoje é grande a busca por tratamentos mais eficientes e que melhorem a qualidade de vida dos pacientes acometidos por essas desordens e sua prevenção.

Dentre essas doenças hemorrágicas, cabe ressaltar a Doença de von Willebrand e as Hemofilias A e B que juntas, afetam cerca de 97% dos indivíduos com alguma deficiência na hemostasia (Peyvandi *et al.*, 2006).

#### **1.1. A Hemostasia**

Uma das principais funções do sangue é manter estável o ambiente interno do corpo, de forma que os processos fisiológicos possam ocorrer normalmente. A fim de manter essa estabilidade, o sangue tem que permanecer fluido dentro do sistema circulatório. No caso de ocorrer um extravasamento de sangue ou o sangue não permanecer fluído, surgem certas modificações que estancam a hemorragia ou atuam na fluidez do sangue. Esse conjunto de mudanças fisiológicas é conhecido como hemostasia. (Tuddenham & Cooper, 1994a).

O processo de hemostasia envolve um mecanismo complexo, multifuncional, finamente regulado e, sobretudo, vital na defesa contra a perda de sangue. Dele depende a formação do coágulo (coagulação) e a sua degradação (fibrinólise) (Marcus & Safier, 1993).

A hemostasia envolve: (1) constrição e retração dos vasos sangüíneos na região lesada; (2) aglutinação, adesão e agregação plaquetárias; (3) a ativação da cascata de coagulação sangüínea, levando à formação da rede de fibrina; (4) a sua posterior dissolução. Em situações em que qualquer um desses componentes esteja alterado, a hemostasia é comprometida e o resultado pode ser tanto uma trombose como uma hemorragia (Tuddenham & Cooper, 1994b; Dahlbäck, 2000).

A lesão tecidual e o rompimento dos vasos induzem a agregação plaquetária pela exposição do colágeno até então indisponível para o contato com proteínas plasmáticas e outros componentes da circulação. Em pequenos vasos, as plaquetas sozinhas são capazes de interromper um sangramento. Em sua forma inativa as plaquetas possuem morfologia discóide; quando ativadas por ADP, trombina, adrenalina, colágeno e fatores teciduais, tornam-se arredondadas, apresentando numerosos pseudópodos, e levando à adesão e agregação plaquetária (*shape change*). Após a lesão vascular, a primeira reação das plaquetas é a sua interação com proteínas adesivas, como o Fator von Willebrand (FvW) e o colágeno no subendotélio. A ativação das plaquetas leva à liberação de ADP, tromboxana e serotonina. A secreção desses agonistas provoca o recrutamento e a agregação de outras plaquetas levando à formação de um tampão celular. Paralelamente à agregação plaquetária, inicia-se a reação de coagulação (Marcus & Safier, 1993; Dahlbäck, 2000).

O caráter essencial do processo de coagulação é que uma proteína circulante, solúvel no plasma, o fibrinogênio, transforma-se em fibrina, o coágulo sólido (Marcus & Safier, 1993). De acordo com os pontos de vista clássicos da coagulação, este é o evento final após duas

seqüências de reações principais: (1) a conversão da protrombina em trombina através da ação da tromboplastina e dos íons de cálcio e (2) a transformação do fibrinogênio em fibrina sob a influência da trombina, sendo envolvidas várias etapas e a ativação de vários fatores de coagulação em cada uma das reações (Tuddenham & Cooper, 1994a). Como esses fatores de coagulação são interdependentes na formação de um coágulo, a deficiência de um ou mais fatores pode resultar em uma resposta hemostática anormal.

### **1.1.1. A Via Clássica da Cascata de Coagulação**

Esta via compreende as cascatas de ativação das vias intrínseca e extrínseca, um conceito, formulado por E.W. Davie e O. Ratnoff e R. G. MacFarlane em 1964 (fig. 1). A via extrínseca, ou via do fator tecidual constitui o principal e mais rápido mecanismo que leva à geração de trombina (Opal & Esmon, 2003). Já a via intrínseca, ou via do contato mediada por superfície negativa ou ainda via do fator FXII, tem papel na sustentação e manutenção do processo sob sua ativação. Nas duas vias atuam cerca de 20 fatores plasmáticos, quase todos de natureza protéica, sendo majoritariamente enzimas que circulam em estado não ativado (zimogênios), suscetíveis à ativação em cascata pelo fator anterior ativo. Vários processos de retroalimentação - tanto positivos como negativos - regulam a cascata de coagulação (Broze, 1995; Dahlbäck, 2000).

Em consequência de uma lesão celular, de uma lesão tecidual ou ainda de um processo inflamatório, o sistema fisiológico latente, representado principalmente pelas plaquetas e pelas proteínas plasmáticas que circulam de forma inativa, é "apresentado" aos componentes celulares estruturais da parede vascular (membrana basal, microfibrilas e colágeno) e torna-se ativado. As plaquetas sofrem mudanças estruturais, emitem pseudópodos e passam a uma etapa de intensa atividade e reatividade, levando à adesão e à secreção de agonistas pró-

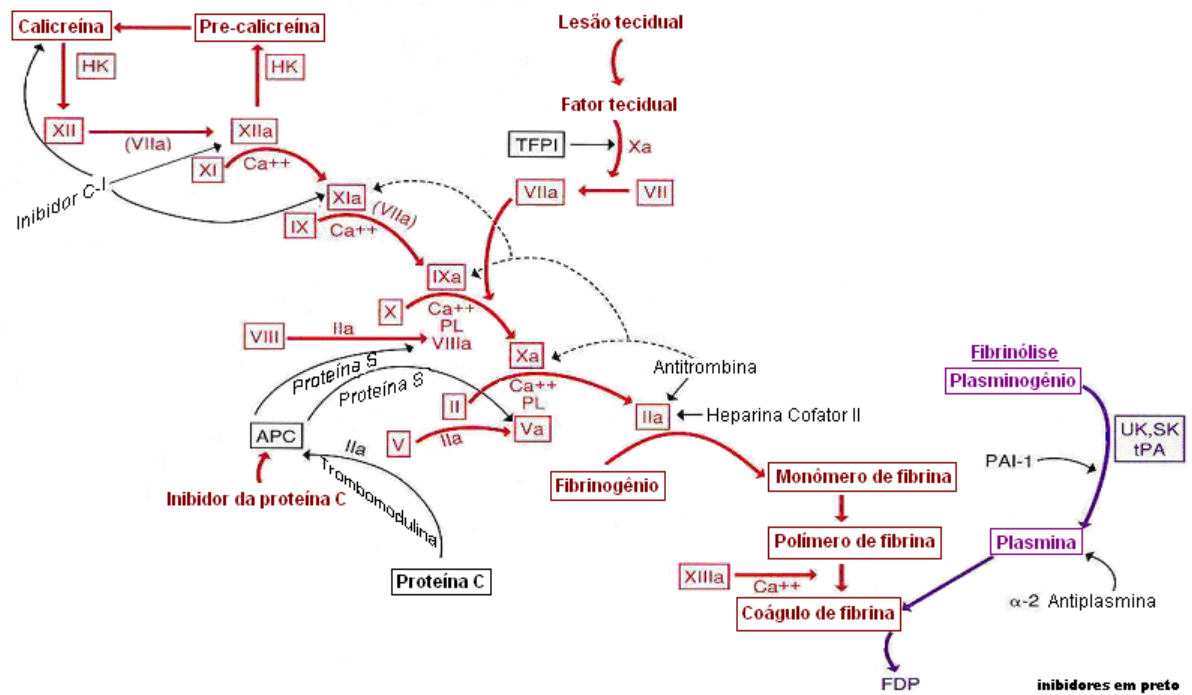
agregantes. O fator tecidual (TF) liberado da membrana das células endoteliais, por sua vez, liga-se às formas zimogênicas do fator VII presentes no sangue. Essa ligação ativa o fator VII (VIIa), promovendo a formação do complexo tenase extrínseco, que depende do cálcio e consiste da interação entre o TF, o fator VIIa e o fator X na membrana fosfolipídica (Tuddenham & Cooper, 1994a; Opal & Esmon, 2003).

O fator XIa, ativado pelo fator XIIa, ativado, por sua vez, pelo fator intrínseco ou de contato (Calicreína), participa da formação do complexo tenase intrínseco, dependente de cálcio e fosfolipídeos de membrana, que envolve a interação dos fatores IXa, VIIIa e X, levando à ativação do fator X (Tuddenham & Cooper, 1994a; Dahlbäck, 2000; Opal & Esmon, 2003).

A ativação do fator X para sua forma ativa Xa, ativa o fator V, possibilitando a formação do complexo protrombinase, formado pelos fatores Xa, Va e protrombina na membrana fosfolipídica das plaquetas. O complexo protrombinase, que também depende de cálcio, leva à conversão da protrombina em trombina, que promove a transformação do fibrinogênio em monômeros de fibrina, além de ativar o fator XIII. O fator XIIIa, por sua vez, promove a formação de ligações covalentes na rede de fibrina, estabilizando o coágulo. O processo é finalizado com a formação de um aglomerado de plaquetas, englobando também outras células, especialmente eritrócitos, o que consolida o coágulo que sela a lesão e interrompe o extravasamento sanguíneo. Após o reparo da lesão tecidual, o coágulo é degradado pela via fibrinolítica (Tuddenham & Cooper, 1994a; Broze, 1995; Dahlbäck, 2000; Opal & Esmon, 2003).

A partir desta via proposta para explicar os mecanismos da coagulação foram baseados os teste *in vitro* de Tempo de Protrombina, Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado, Dosagens dos Fatores de Coagulação e Dosagens dos Inibidores de Fatores de Coagulação VIII e IX, empregados na triagem e detecção de deficiências de fatores de coagulação.





**Fig. 1. A via clássica da cascata da coagulação sanguínea.** Representação da Via Extrínseca e Intrínseca da Coagulação. Adaptado de Enzyme Research Co., Reino Unido, 2005. <http://www.enzymeresearch.co.uk/coag.htm>, acesso em Março de 2005.

### **1.1.2. A Via Celular-Enzimática da Cascata de Coagulação**

Em 2001 um novo modelo de coagulação sanguínea, baseado em células, foi proposto, enfatizando a interação dos fatores da coagulação com superfícies celulares específicas (Hoffman & Monroe, 2001, Hoffman, 2003a; Hoffman, 2003b, Bishop & Lawson, 2004). Esse modelo se baseia numa série de três etapas (Iniciação, Propagação e Amplificação) que ocorrem em diferentes tipos celulares (fig. 2).

A etapa de iniciação ocorre em células extravasculares carreadoras de TF (fibroblastos do estroma, células mononucleares, macrófagos e células endoteliais) que só expõem o TF ao sangue quando ocorre um dano vascular ou uma inflamação (fig. 2a). Com a liberação do TF na superfície das células extravasculares ocorre a formação do complexo fator VIIa/TF, que ativa pequenas quantidades dos fatores IX e X. Esse fator Xa associado ao seu cofator, Va, forma o complexo protrombinase na superfície das células carreadoras de TF. O fator V pode ser ativado pelo fator X ou por outras proteases não coagulantes. Cabe ressaltar que níveis baixos de TF ocorrem no espaço extravascular todo o tempo, sendo liberados por diferentes tipos celulares.

Alguns fatores de coagulação, como o FVII, atravessam a camada endotelial dos vasos, podendo ser encontrados na linfa. Assim, o FVIIa pode ser encontrado ligado ao TF mesmo na ausência de lesão vascular e os fatores IX e X podem ser ativados quando passam pelos tecidos. Esse fenômeno, chamado de coagulação basal, não leva a formação de um coágulo em situações normais devido à ausência de componentes de alta massa molecular, como plaquetas e o complexo FVIII/FvW. O processo prossegue para a segunda etapa, a fase de

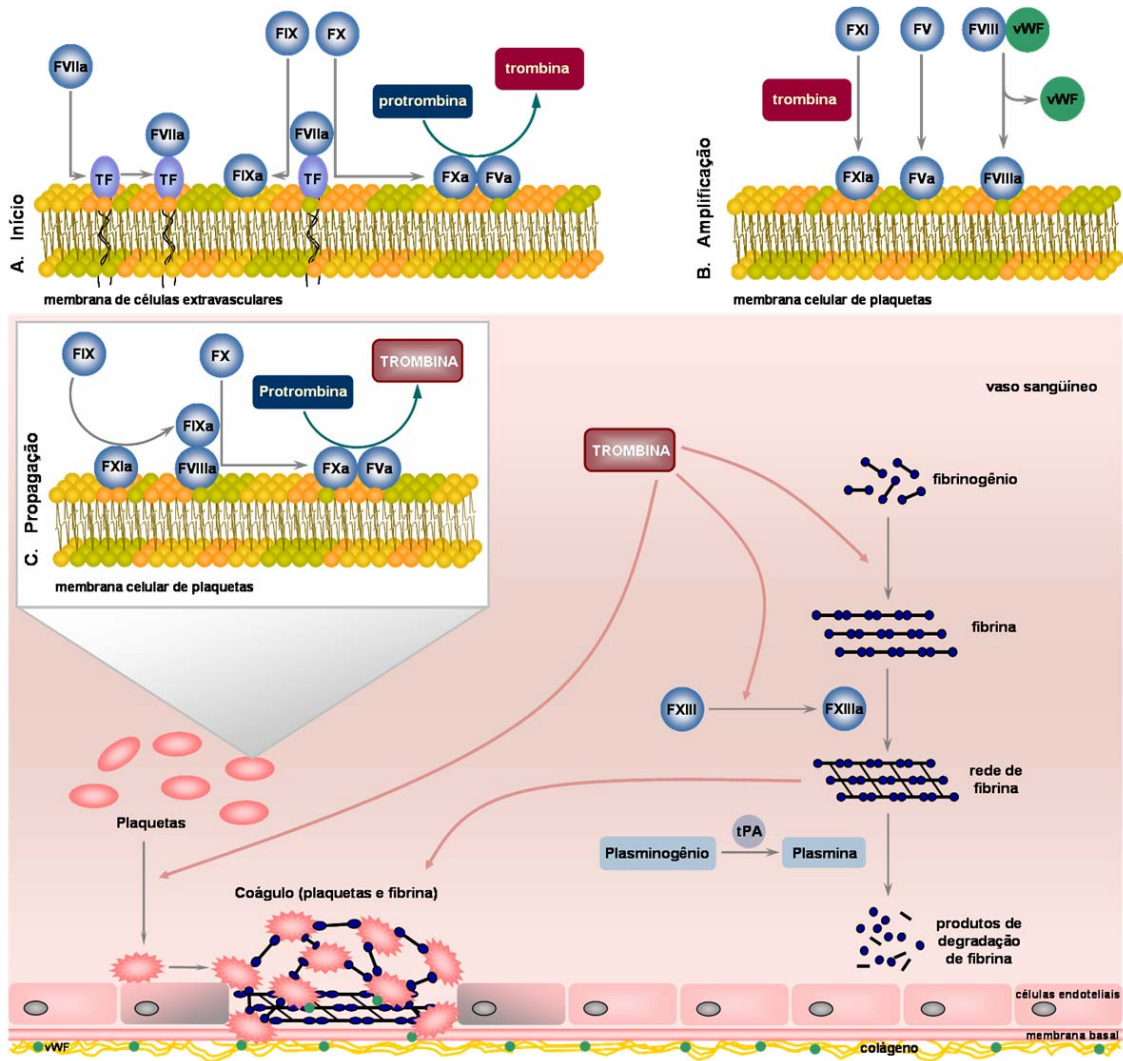
amplificação, apenas quando um dano vascular permite que plaquetas e o fator VIII/FvW entrem em contato com o tecido extravascular.

A segunda fase, a fase de amplificação (fig. 2b) é preparatória para a subsequente ativação da trombina em grande escala na fase de propagação. A pequena quantidade de trombina gerada nas células carreadoras de TF possui várias funções, entre elas a ativação de plaquetas, expondo receptores e sítios de ligação para fatores de coagulação ativos e liberando formas de fator V parcialmente ativadas em suas superfícies. A trombina formada na fase inicial também ativa os fatores V e VIII na superfície de plaquetas ativadas. Nesse contexto, o complexo fator VIII/FvW dissocia-se, permitindo que o FvW plasmático atue como mediador adicional na adesão e agregação plaquetária. Também nessa fase o fator XI na superfície das plaquetas é ativado a fator XIa pela trombina.

A fase de propagação (fig. 2c) ocorre na superfície das plaquetas ativadas aderidas e agregadas no local da lesão. O fator IXa (ativado via VIIa ou trombina) se liga ao fator VIIIa nas plaquetas. Já que o fator Xa não pode se mover das células carreadoras de TF até as plaquetas ativadas, este deve ser suprido diretamente na superfície plaquetária pelo complexo fator IXa/VIIIa (complexo Xase). O fator Xa rapidamente se associa com o fator Va ligado às plaquetas na fase de amplificação. A formação do complexo protrombinase leva à ativação da protrombina em grandes quantidades, levando à clivagem do fibrinogênio e à formação de fibrina.

A trombina também ativa o fator XIII em XIIIa, uma transglutaminase plasmática. O fator VIIIa catalisa a modificação covalente entre monômeros de fibrinas, formando a rede estável de fibrina. A reação envolve a formação de uma ligação amida entre o grupamento carbonil de resíduos de glutamina e de uma molécula de fibrina e o aminogruppo da cadeia lateral de resíduos de lisina em outra molécula de fibrina, formando o coágulo estável de fibrina (Hettasch & Greenberg, 1998).

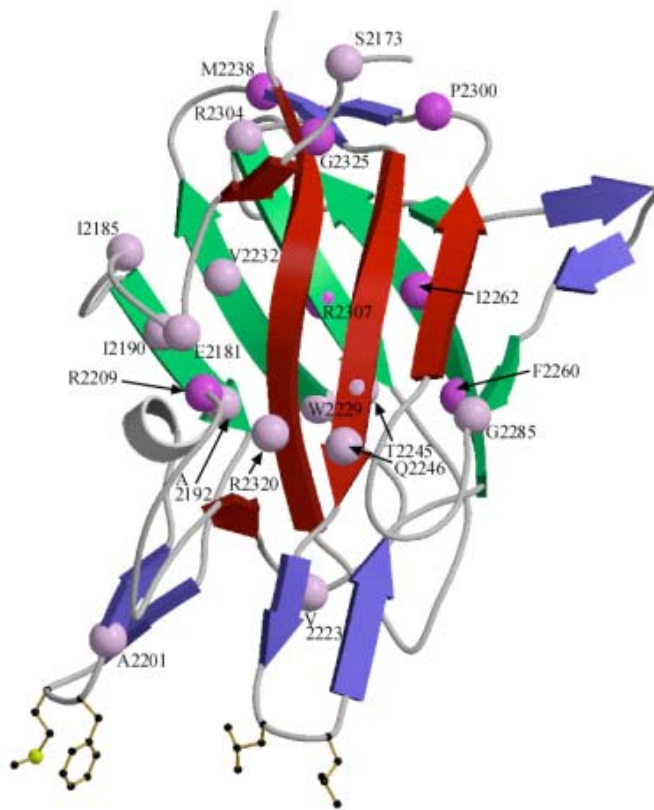
Todo o processo de coagulação é regulado por outros componentes fisiológicos circulantes, tais como o inibidor da via do fator tecidual, fosfolipase A2, fosfodiesterase, 5'-nucleotidase, antitrombina III, via anticoagulante da proteína C/trombomodulina, que inativam os fatores Va e VIIIa. Além disso, a via regulatória composta pelo plasminogênio também tem um papel importante na degradação da rede de fibrina gerada pela ativação do processo hemostático. O sistema de plasminogênio possui também participação em vários processos celulares. A via é ativada por dois ativadores fisiológicos de plasminogênio: ativador de plasminogênio do tipo tissular (t-PA) e ativador do plasminogênio tipo uroquinase (u-PA). A via de ativação mediada por t-PA está primariamente envolvida na homeostase da fibrina. Já, a via mediada por u-PA está envolvida em fenômenos como migração celular e remodelagem de tecidos. O plasminogênio ativado gera plasmina, que atua na degradação de fibrina e fibrinogênio e na ativação de metaloproteinases de matriz responsáveis pela degradação da matriz extracelular. A inibição do sistema de regulação do plasminogênio ocorre na etapa de ativação do plasminogênio, pela ativação específica de inibidores de ativadores de plasminogênio (PAI) e diretamente na plasmina ativa, através da serpina  $\alpha$ 2-antiplasmina (Collen, 1999; Vaughan e Declerk, 1998).



**Fig. 2. Modelo via celular-enzimática da cascata da coagulação sanguínea.** Baseado em Hoffman (2003a) e Bishop & Lawson (2004). Cedido gentilmente por Markus Berger, comunicação pessoal.

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

O Fator VIII (FVIII) (fig. 3) é uma glicoproteína que serve como cofator para o fator IXa (serinoprotease) na conversão do fator X em fator Xa na via intrínseca da coagulação (Kaufman, 1992). Após, o fator Xa ativa a protrombina (fator II) em trombina (fator IIa), que cliva o fibrinogênio em fibrina, formando o coágulo (fig. 1) (Tuddenham & Cooper, 1994a; Broze, 1995; Dahlbäck, 2000; Opal & Esmon, 2003). O FVIII é identificado no plasma pela sua atividade pró-coagulante (FVIII:C) ou pela atividade antigênica (FVIII:Ag) (Lenting *et al.*, 1998).



**Fig. 3. Estrutura molecular do FVIII.** Retirado de: Escola de Medicina– Universidade de Washington, <http://Depts.Washington.Edu/Mednews/Research/Hemophilia.Html>. Acesso em Março de 2005. Em roxo os principais motivos imunogênicos.

#### 1.1.4. O Gene e a Estrutura do FVIII

O gene do FVIII é amplo e estruturalmente complexo, contendo 26 éxons (Fig. 4; Tabela 1), apresentando aproximadamente 186 kb de DNA genômico e está localizado no cromossomo Xq28 (Gitscheir *et al.*, 1984; Peake, 1995). Os íntrons representam cerca de 95% do gene (177kb), enquanto que os éxons, constituem os restantes 5% (9kb) (Gitscheir *et al.*, 1984; Toole *et al.*, 1984, Bowen, 2002).

O RNA mensageiro (mRNA) do fator VIII compreende cerca de 9.010 nucleotídeos que codificam um polipeptídeo precursor de 2.351 aminoácidos. Após o processamento do peptídeo sinal (19 aminoácidos), origina-se uma proteína madura de 2.332 aminoácidos (Vehar *et al.*, 1984). A proteína madura foi isolada e purificada por Fay *et al.* (1982) e sua estrutura primária foi primeiramente descrita em 1984 (Gitscheir *et al.*, 1984; Vehar *et al.*, 1984).

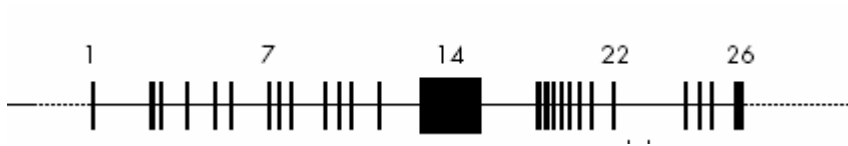
A partir da análise de seqüências de nucleotídeos e aminoácidos, observou-se a existência de regiões de homologia interna no FVIII, sendo estabelecidos 3 domínios estruturais diferentes, denominados, A, B e C, abreviados como NH<sub>2</sub>-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH (Vehar *et al.*, 1984).

O FVIII é ativado por proteólise, catalisada pela trombina (FIIa), onde os principais sítios de clivagem para a ativação encontram-se na região C-terminal dos resíduos de arginina nas posições 372, 740 e 1689 (Tuddenham & Cooper, 1994a). A partir dessa clivagem, ocorre a liberação do domínio B, e a formação do FVIIIa a partir da ligação com o Ca<sup>+2</sup> (fig. 5).

A estabilidade do FVIII depende da interação não-covalente com o fator von Willebrand, que também atua na adesão e agregação plaquetárias. Tal interação, além de promover a estabilidade do FVIII, aumenta a sobrevivência do FVIII circulante, já que confere



uma proteção contra a degradação proteolítica na circulação sanguínea, bem como a inibição da neutralização do FVIII por anticorpos (Jacquemin & Saint-Remy, 1998).

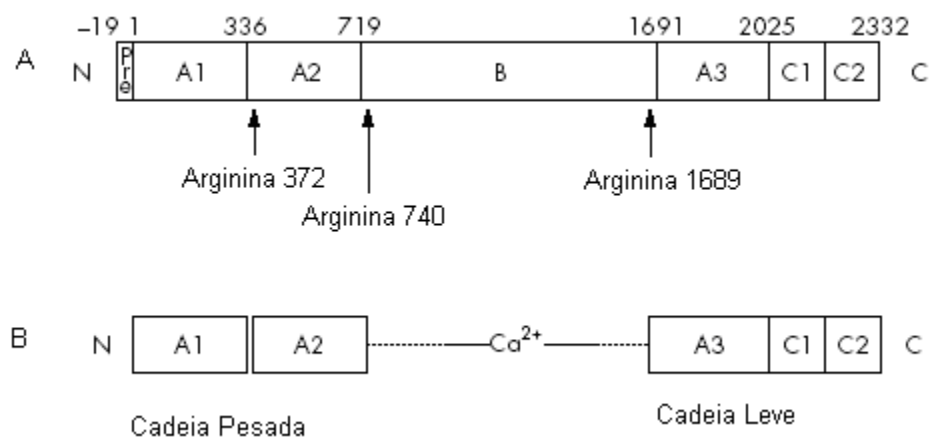


**Fig. 4. Organização física do gene do FVIII humano.** As Barras Representam os Éxons do Gene. Baseado em Gitscheir *et al.*, (1984).

**Tabela 1. Organização do gene do FVIII humano.**

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

Baseado em Gitscheir *et al.*, (1984).



**Fig. 5. Domínios estruturais de ativação do fVIII.** Baseado em Bowen (2002). N, região aminoterminal; C, região carboxiterminal; (A) FVIII sintetizado contendo a pré-sequência de 19 aminoácidos (peptídeo sinal) e o peptídeo maduro de 2332 aminoácidos. A1, A2, A3, B, C1 e C2 representam os domínios de homologia. Os resíduos de arginina são os sítios de ativação e clivagem pela trombina. (B) FVIII ativado. Os dois domínios (A e C) correspondem às cadeias leve e pesada, ligadas pelo cálcio divalente.

## **1.2. As Hemofilias**

O termo hemofilia foi proposto inicialmente por Schölein em 1820, sendo a sua separação em dois tipos sugeridos por Pavlovsky (1947) e a distinção entre as hemofilia A e B por três grupos independentes: Aggeler *et al.* (1952), Biggs *et al.*, (1952) e Schulman & Smith, (1952) (conferir Da Costa, 2004).

A Doença de von Willebrand, bem como as hemofilias A e B, são as coagulopatias hereditárias mais freqüentes na população mundial, e resultam em sangramentos prolongados após lesões, extrações dentárias ou cirurgias. A hemofilia A é caracterizada pela redução da atividade do fator VIII circulante no plasma, enquanto a hemofilia B é causada pela redução da atividade do fator IX, ambos fatores da via intrínseca da coagulação sangüínea.

### **1.2.1. A Hemofilia A**

A hemofilia A é uma das doenças hemorrágicas mais freqüentes da via intrínseca da cascata de coagulação sangüínea. Ela é causada pela redução da atividade do fator VIII da coagulação (FVIII), devido a alterações no gene do FVIII (Gitscheir *et al.*, 1984; Lander *et al.*, 2001). O padrão de herança é recessivo ligado ao X, e a condição clínica afeta, aproximadamente, 1 em cada 5000 nascimentos masculinos (Hoyer, 1994 *apud* Soares *et al.*, 2001). No Rio Grande do Sul, a prevalência estimada é de 1:11.700 homens (Alexandre & Roisenberg, 1985).

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

### **1.2.2. Sintomatologia e Classificação dos Hemofílicos do tipo A**

As manifestações hemorrágicas podem aparecer já no primeiro ano de vida e sua gravidade depende dos níveis plasmáticos de FVIII. As hemorragias podem ser espontâneas ou precedidas por traumas, podendo ocorrer sob a forma de hematúria, epistaxe, melena/hematêmese, ou se apresentarem como hematomas, sangramentos retroperitoneais e intra-articulares (hemartroses), que constituem os aspectos mais característicos das formas graves (Gilbert, 1981; Rezende *et al*, 2005).

Os pacientes podem ser classificados em três grupos (graves, moderados e leves) de acordo com as características clínicas apresentadas e a dosagem do fator VIII no plasma (FVIII:C). A classificação, segundo a International Society of Thrombosis and Haemostasis e o Ministério da Saúde, quanto à atividade do fator VIII, estabelece que os graves apresentariam <1%, os moderados de 1 a 5% e os leves de 5 a 50% (Forbes & Madhok, 1991, Rezende *et al*, 2005).

Cerca de 50% dos indivíduos afetados são hemofílicos graves (Tuddenham & Cooper, 1994b; Antonarakis *et al.*, 1995; Bowen & Keeney, 2003), já os moderados e leves, ocorrem nas frequências de 30% e 20%, respectivamente (Antonarakis *et al.*, 1995).

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

### **1.2.2.1. O Tratamento de Pacientes com Hemofilia A**

Atualmente o tratamento baseia-se na administração de fator VIII utilizando-se uma variedade de preparações derivadas de plasma humano, como o crioprecipitado, infusão de FVIII purificado ou obtido por técnicas de DNA recombinante. A terapia de substituição é efetiva na maioria dos casos, porém, 7 a 30% dos indivíduos tratados desenvolvem anticorpos que neutralizam o FVIII infundido e diminuem sua efetividade, denominados de inibidores do FVIII (Lusher *et al.*, 1993; Rieger, 1996, Rezende *et al.*, 2005).

### **1.2.2.2. As Mutações no Gene do FVIII e a hemofilia A**

A redução da atividade do fator VIII da coagulação (FVIII) ocorre por alterações no gene, localizado na região Xq28 humano (Gitscheir *et al.*, 1984; Lander *et al.*, 2001, Bowen, 2002). Estudos moleculares indicam que mutações de ponto são os defeitos genéticos mais comuns, correspondendo a mais da metade dos casos, seguidos pelas deleções e pelos casos de inserções e rearranjos/inversões. Em pacientes com hemofilia A, as inversões no gene do FVIII são responsáveis por 20% de todos os casos dessa doença, sendo que em hemofílicos leves e moderados são eventos muito raros e em hemofílicos graves apresentam uma alta prevalência, sobretudo a inversão do intron 22 (Antonarakis *et al.*, 1995; Bowen, 2002).

Em uma revisão e estudo de meta-análise, Antonarakis *et al.* (1995) investigaram mutações no gene do FVIII em 1000 pacientes não consanguíneos. Os resultados foram: 46% dos hemofílicos graves apresentaram mutações de ponto, 42% inversões, 8% deleções, e 4% não apresentaram qualquer dessas mutações. No mesmo estudo, 91% dos hemofílicos benignos apresentaram mutações de ponto e em 9% não foram encontradas mutações. Dentre as mutações de ponto estavam incluídas: mutações do tipo *missense* (53%); CpG-para-TpG (16%); pequenas deleções (12%); mutações do tipo *nonsense* (9%); pequenas inversões (3%);

mutações em sítios de *splicing* (3%); polimorfismos *missense* (2%); mutações silenciosas em exons (2%) e mutações de inserção (1%).

Resultados similares foram descritos por Bagnall *et al* (1998, 2002, 2005), que estudaram as inversões do intron 1 e 22 em 209 pacientes, onde 45% dos hemofílicos graves apresentavam a inversão do intron 22; 3% a inversão do intron 1; 40% apresentavam rearranjos; deleções e mudanças na fase de leitura, mutações *nonsense* ou de *splicing* e 10% mutações *missense*. Quanto aos hemofílicos benignos e moderados, 97% apresentavam rearranjos, deleções, mudanças na fase de leitura, mutações *nonsense* ou de *splicing* e 1% possuía mutações *missense*; nenhum apresentou as inversões do intron 1 ou 22.

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

Como já indicado acima, duas inversões compreendem as mutações mais freqüentemente encontradas (inversão do intron 22 e inversão do intron 1), ocorrendo em aproximadamente 50% dos hemofílicos do tipo grave (Liu & Sommer, 1998; Liu *et al.*, 1998; Bagnall *et al.*, 2002), não havendo registros dessas duas inversões em hemofílicos com formas moderadas ou leves (Rossetti *et al.*, 2004). Portanto, torna-se interessante o estudo dessas duas inversões em hemofílicos graves, devido à sua alta freqüência.

Outras mutações que causam hemofilia A são muito diversificadas, sendo descritas atualmente mais de 950, sendo 270 mutações em hemofílicos graves. A maioria são simples substituições de nucleotídeos (aproximadamente 65%), seguidas em freqüência por pequenas deleções, inserções e outros rearranjos e inversões (Hamsters, acesso janeiro, 2008). Essa



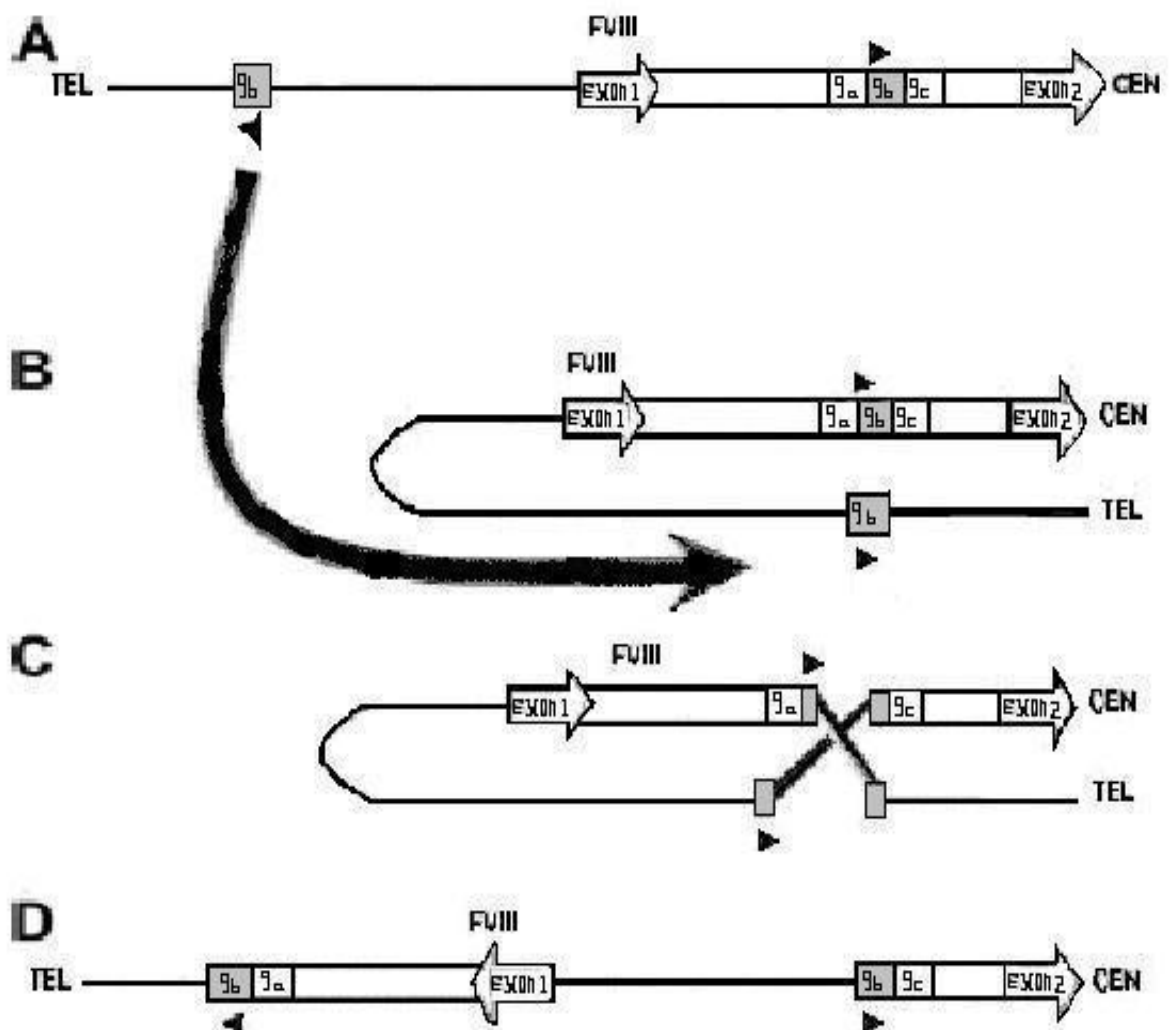
variabilidade genética dificulta o rápido diagnóstico molecular de hemofílicos, pois a sua avaliação global implicaria na varredura de todo o gene.

### **1.2.2.3. A Inversão do Intron 1 (Inv1)**

A inversão do intron 1 (Inv1) é a segunda inversão mais freqüente descrita na literatura, ocorrendo em cerca de 5% dos casos de hemofílicos A graves da população mundial (Bagnall *et al.*, 2002; Tizzano *et al.*, 2003).

Os primeiros relatos dessa inversão foram apresentados por Brinke *et al.* (1996); havia alteração do primeiro intron do FVIII com deslocamento da maior parte do exon 1 (100 kb) em direção ao telômero. Essa inversão era causada por um rearranjo cromossômico que envolvia uma recombinação homóloga intracromossômica (Kenwrick *et al.*, 1992). Em outros estudos, Brinke *et al.* (1996) notaram que a Inv1 criava 2 unidades de transcrição híbridas. Uma seqüência de 1041 pares de base do intron 1 (Int1h-1) foi encontrada duplicada e a de orientação oposta (Int1h-2) a cerca de 140 kb fora do gene. A Int1h-1 é formada pelo promotor e o primeiro exon de fator VIII e expressa as seqüências que estão entre uma região denominada de C6.1A e a região telomérica (Tizzano *et al.*, 2003). A outra unidade de transcrição híbrida contém as ilhas CpG, toda a região C6.1A e parte do gene.

O mecanismo de formação da Inv1 envolve um evento de recombinação intracromossômica, entre as seqüências homólogas Int1h-1 localizada no éxon e Int1h-2 localizada a 100 kb da região 5' do gene (Bagnall *et al.*, 2002) (Fig. 6), levando à produção de uma proteína truncada, um FVIII não funcional (Acquila *et al.*, 2003a).



**Fig. 6. Mecanismo hipotético de formação da Inv1.** Baseado em Bagnall *et al.* (2002), com modificações. TEL, região centromérica; CEN, região centromérica. (A) As barras mostram o intron 1 flanqueado pelos éxons, as setas indicam o sentido da transcrição contendo a seqüência repetida 9b (em cinza) flanqueada por uma seqüência única 9a ou 9c. Fora do gene há uma seqüência homóloga ao 9b (B, C). A recombinação homóloga entre as seqüências 9b acaba originando essa inversão. (D) Resultado da inversão do intron 1, gerando as regiões 9ab, 9ac e 9bc.

#### 1.2.2.4.A Inversão do Intron 22 (Inv22)

Com o interesse de buscarem novas informações a respeito do genoma humano Patterson *et al.* (1989) verificaram que seqüências do genoma eram reconhecidas por uma mesma sonda em duas regiões do cromossomo X (Xq28). Uma região dentro do intron 22 do gene do fator VIII e outra localizada 1,2 kb do gene. Levinson *et al.* (1990) procurando transcritos na região Xq28, encontraram uma região denominada de A (F8A) que hibridizava com uma região do exon 22 do gene do fator VIII. A F8A estava em orientação inversa à região do gene e continha uma região homóloga ao intron 22. Análises computacionais sugeriam que se tratava de uma região codificadora e o cDNA da F8A também apresentava um bom grau de similaridade em ratos, camundongos e macacos.

O cromossomo X contém 3 cópias de F8A e suas regiões adjacentes, sendo uma no intron 22, denominada de Int22h1 e duas cópias adicionais na região telomérica *upstream*, a aproximadamente 500kb ao códon de início do gene do fator VIII (Int22h2 e Int22h3) (Freije & Schlessinger (1992). O intron 22 encontra-se numa região de 32 kb e contém uma ilha de CpG, a aproximadamente 10 kb *downstream* do exon 22 (Int22h1). Esta ilha parece servir como um promotor bidirecional para os Int22h2 e Int22h3 (Lakich *et al.*, 1993).

A inversão do intron 22 (Inv 22) origina-se de uma recombinação homóloga intracromossômica entre uma região de 9,5 kb do intron 22 (Int22h1) e uma região homóloga extra-gênica, proximal (Int22h2) ou distal (Int22h3) do gene, próximo à região telomérica (Lakich *et al.*, 1993; Antonarakis *et al.*, 1995; Naylor *et al.*, 1995). Estas seqüências repetidas possuem uma identidade de mais de 99% (Naylor *et al.*, 1993).

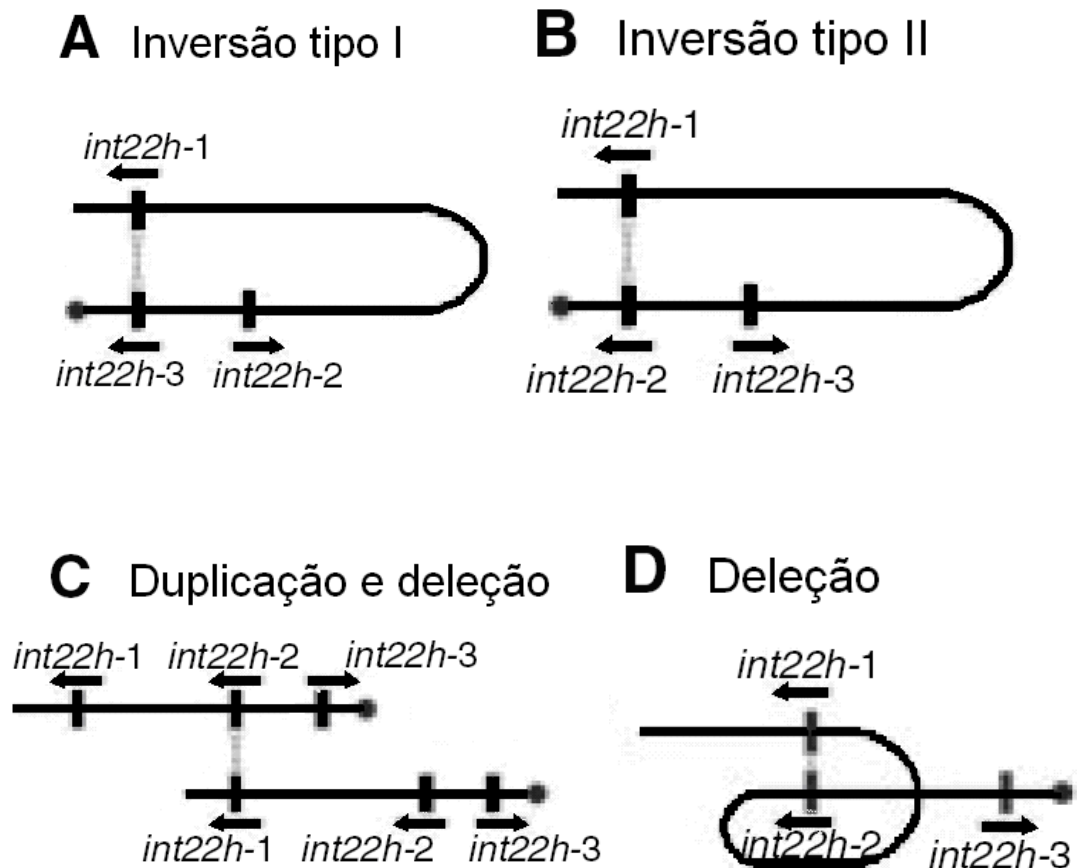
Os trabalhos de Naylor *et al.* (1991, 1992) demonstraram que mutações envolvendo regiões do intron 22 levavam a um acoplamento defeituoso dos éxons 22 e 23 no RNAm sendo uma das causas de hemofilia A grave em pacientes afetados no Reino Unido.

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

Oldenburg *et al.* (2000) demonstraram que a Inv22 pode se apresentar como um mosaicismo somático e que a inversão não é restrita a divisões celulares meióticas mas também pode acontecer durante divisões mitóticas, ou em precursores das células germinativas ou de células somáticas. Além disso, nas células germinativas femininas, o emparelhamento do Xq com seu homólogo inibe a inversão intracromossômica do intron 22 e esse evento de inversão ocorreria predominantemente em células germinativas masculinas, com uma relação de 3:1 (Oldenburg *et al.*, 2000; Leuer *et al.*, 2001).

Antes do ano de 2000 pensava-se que as duas cópias extragênicas possuíam o mesmo sentido e que este era oposto ao gene. Com isso, ao ocorrer a recombinação homóloga da região gênica Int22h1 com umas das regiões Int22h extra gênicas, proximal (Int22h2) ou distal (Int22h3), ocorreria a interrupção do gene do FVIII e a produção de um transcrito

defeituoso (fig. 7A e B), não gerando o FVIII ou gerando um FVIII truncado (Naylor *et al.*, 1991; 1992). Porém com os avanços nas técnicas de seqüenciamento humano, ao contrário do que se pensava, as cópias na porção mais telomérica ao gene (Int22h2 e Int22h3) foram identificadas como estando em uma orientação inversa uma em relação à outra, podendo se comportar como seqüências palindrômicas (Ross *et al.*, 2005; Bagnall *et al.*, 2006). Com isso, um evento de recombinação homólogo, intracromossômico e não alélico entre as cópias Int22h levaria ao mecanismo de inversão clássica (fig. 7A e B). Porém um evento de recombinação homóloga inter-cromossômica entre as cópias de mesmo sentido causaria uma duplicação-deleção recíproca (fig. 7C e 7D) (Bagnall *et al.*, 2006).



**Fig. 7. Mecanismo hipotético de formação da *inv22*.** Baseado em Bagnaliet *al.* (2006). As setas representam o sentido da transcrição. (A) Recombinação homóloga intracromossômica distal ao gene; (B) Recombinação homóloga intracromossômica proximal; Exons 1 a 22 apresentam orientação invertida levando à produção de um transcrito defeituoso e de um FVIII truncado. (C) Recombinação homóloga intercromossômica causando deleção e duplicação recíproca. (D) recombinação homóloga intracromossômica causando deleção;

### 1.3. O Desenvolvimento de Inibidores Contra o FVIII

Uma das complicações mais sérias no tratamento de hemofílicos é o desenvolvimento de anticorpos (inibidores) contra o FVIII, cuja ampla maioria é pertencente à classe IgG (Rieger, 1996), o que leva à diminuição da qualidade e expectativa de vida dos pacientes (Scandella *et al.*, 1993). A incidência de inibidores em diferentes populações de hemofílicos A é muito ampla, variando de 7 a 30% (Lusher *et al.*, 1993), sendo que no Brasil ela foi estimada em torno de 20% (Rieger & Roisenberg, 1999).

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

Títulos do inibidor de tipo I apresentam-se altos após infusões repetidas de concentrados de fator VIII e mantêm-se elevados mesmo na ausência de tratamento (estímulo), podendo ser detectadas suas concentrações durante meses e até anos (resposta anamnésica) (Aly & Hoyer, 1992; Aly *et al.*, 1992).

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

Segundo Rieger (1996), dois grupos liderados por M. S. Gawryl e L.W. Hoyer em 1982 estudaram a inativação do FVIII nos dois tipos diferentes de inibidores e sugeriram que

inibidores do tipo I e do tipo II interagem com diferentes determinantes antigênicos do FVIII. Inibidores do tipo I interagem com determinantes próximos ao sítio da atividade pró-coagulante, enquanto que os do tipo II interagem com o determinante próximo ao sítio de ligação do FVIII com o fator von Willebrand (FvW). Neste caso, o impedimento estérico explicaria a maneira de inativação do FVIII:C pelos inibidores do tipo II (Rieger 1996).

Doenças autoimunes, como artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico e polimiosites; malignidades; doença inflamatória intestinal e certas inflamações cutâneas estão associadas com inibidores do tipo II. (Aly & Hoyer, 1992; Aly *et al.*, 1992; Nilsson, 1994; Fay, 1999; Gill, 1999).

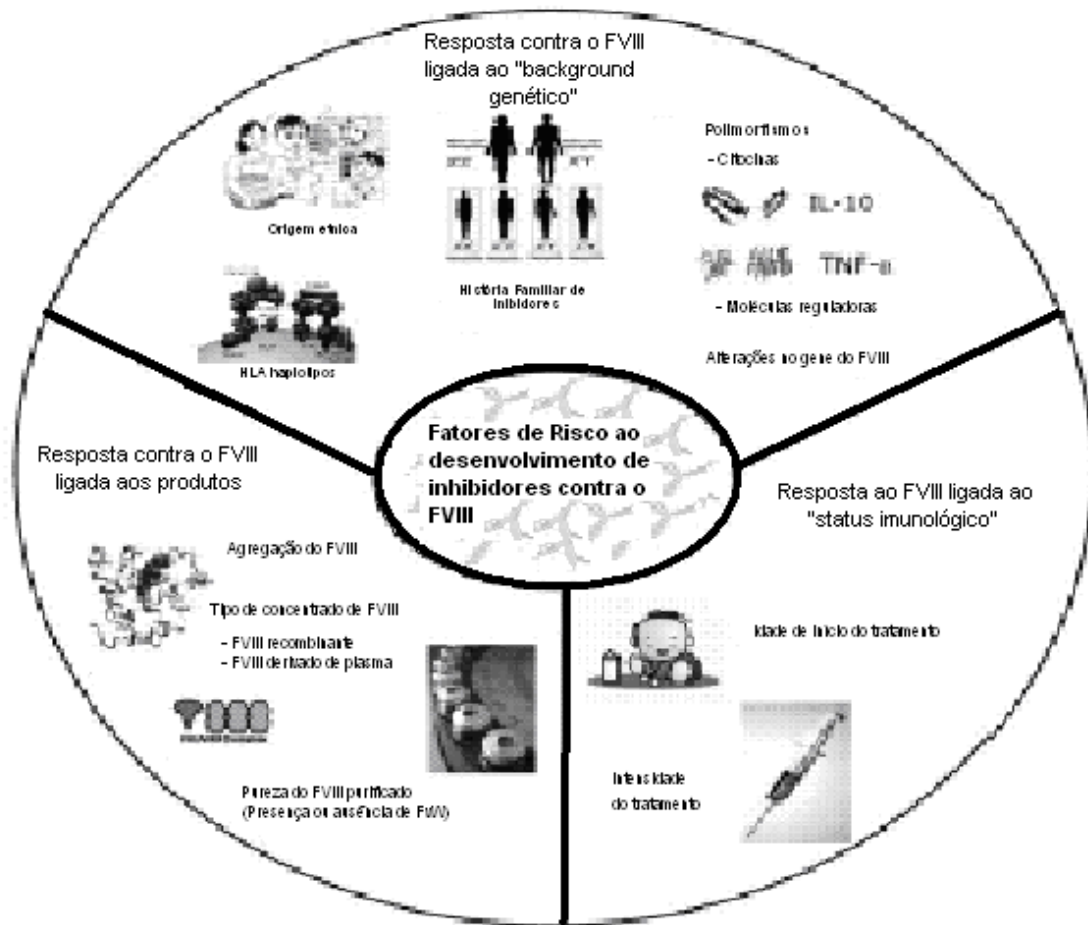
Algiman *et al.* (1992), estudando doadores de sangue saudáveis, verificaram que 17% apresentam inibidores. Apesar dos anticorpos detectados serem do tipo IgG e apresentarem atividade neutralizante contra o FVIII, os níveis médios de atividade do FVIII não diferiram significativamente entre os grupos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

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

Alguns trabalhos mostram que hemofílicos portando certos tipos de mutações no gene do FVIII, dentre eles inversões e grandes deleções, podem apresentar o desenvolvimento de inibidores (Ljung *et al.*, 1992; Nilsson & Lamme, 1993; Hoyer, 1995; Tuddenham & Mcvey,



1998; Bowen, 2002; Astermark *et al.*, 2005). Além disso, a produção de inibidores pode variar conforme a idade, a origem étnica, a dose de FVIII administrada, a frequência de exposição, a idade do primeiro tratamento e a atividade do produto (Astermark *et al.*, 2005; Penner, 2001; Nilsson & Lamme, 1993; Dasgupta *et al.*, 2007). A figura 8 resume, em grandes blocos, os fatores acima mencionados.



**Fig. 8. Fatores de risco associados com o desenvolvimento de resposta imune contra o FVIII em hemofilia A. Dasgupta *et al.*, 2007.**

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

O presente trabalho visa o estudo de duas inversões (Inv1 e Inv22) presentes no gene do Fator VIII em hemofílicos A graves, bem como uma série de outras características relacionadas com o desenvolvimento de inibidores do FVIII nos pacientes, com o intuito de auxiliar na obtenção de mais informações sobre o perfil dos hemofílicos A do tipo grave do Rio Grande do Sul.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Dentre os objetivos específicos destacam-se:

- A verificação da frequência das duas inversões (inv1 e inv22) nas amostras estudadas e com base nessas informações a estimativa de suas frequências na população de hemofílicos;
- Caracterizar as populações de hemofílicos A grave quanto à etnia e ao número de pacientes/famílias com hemofilia A portando essas inversões;
- Verificar a possível associação entre a presença dessas inversões e a produção de inibidores nos hemofílicos estudados.
- Estudar outros fatores relacionados ao desenvolvimento de inibidores nos pacientes estudados (etnia, idade, casos múltiplos familiares, tipo de tratamento utilizado, sua dose e duração, presença de infecção viral crônica).

**Capítulo 2. Introns 1 and 22 inversions and factors VIII inhibitors in patients with severe hemophilia A in southern Brazil**

Artigo submetido para publicação na revista “Haemophilia”.

Introns 1 and 22 inversions and factor VIII inhibitors in patients with  
severe haemophilia A in southern Brazil

LEONARDO BARBOSA LEIRIA, ISRAEL ROISENBERG, FRANCISCO MAURO  
SALZANO AND ELIANE BANDINELLI

Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

RUNNING TITLE: INVERSIONS 1 AND 22 IN BRAZILIAN HAEMOPHILIACS

**Keywords:** inversions 1 and 22, factor VIII inhibitors, severe haemophilia A, antibody formation, Brazilian haemophiliacs, risk factors

Correspondence: Prof. Francisco M. Salzano, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel + 55 51 3308-6747, Fax: + 3308-9823; e-mail: [francisco.salzano@ufrgs.br](mailto:francisco.salzano@ufrgs.br)

**Summary.** A total of 107 unrelated severe haemophilia A patients living in the southern Brazilian state of Rio Grande do Sul were studied in relation to the prevalences of inversions present in introns 22 and 1, and a subsample of them (95) tested for the presence of Factor VIII inhibitors. These data were then incorporated with those from 13 other countries and 2,509 patients. The frequencies of these two inversions show a remarkable homogeneity in series collected in different continents, from people with diverse ethnic extraction. The prevalence of inhibitors among patients with inversion 22, on the other hand, vary widely (5%-51%), the value observed by us being the highest. The importance of obtaining data from patients throughout the world to clarify the aetiology of this important complicating factor in the therapeutics of the disease is emphasized.

## **Introduction**

Haemophilia A is characterized by a wide heterogeneity of changes in the Factor VIII (FVIII) gene. In severe haemophilia A (FVIII levels lower than 1%) the only common gene defects are intron 1 (inv. 1) and intron 22 (inv. 22) inversions. Inv. 22 is much more frequent than inv. 1 but both lead to highly defective FVIII proteins and in this way increase the risk of formation of inhibiting anti-FVIII antibodies that interfere with treatment [1-5]. As part of a long-term project we have been conducting for more than three decades now (selected references in [6-9]) on different aspects of haemorrhagic diseases in our population, the present report presents data on the prevalences of these two inversions in severe haemophiliacs A from southern Brazil and their association with the presence of anti-FVIII inhibitors. Two questions of general interest were asked: (a) do the frequencies of inv. 22 and inv. 1 vary among severe haemophilia A patients distributed throughout the world? and (b) how variable is the presence of anti-FVIII inhibitors in these series? In this way we are contributing to enhance the knowledge about this important complicating factor in the therapeutics of the disease.

## ***Materials and methods***

### **Patients and samples**

The study included 107 unrelated families with 168 patients having severe haemophilia A who are assisted by Rio Grande do Sul's (Brazil) Center of Haematology and Haemotherapy (HEMOCENTRO-RS). We have been collaborating with its staff for many years now, providing specialized diagnosis for a series of haemorrhagic and other types of haematological disorders. The average age of the patients was  $21 \pm 14$  years and 89% of them were of European descent, the remaining 11% being of African or mixed origin, as ascertained by visual inspection. Since no significant differences in relation to the variables studied were obtained between Euro and Afro-Brazilians their results were pooled, but separate frequencies according to continental origin can be supplied on request. 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 was collected in tubes with sodium citrate and DNA extraction carried out by nonenzymatic and salting-out methods [10, 11].

## Laboratory and statistical tests

Inverse PCR was employed for the detection of inv. 22 as described in [12], while a rapid PCR was used for the identification of inv. 1 according to the technique of Bagnall *et al.* [13]. Inhibitor titrations were performed using the Bethesda assay [14], and its absence was defined as less than 1 BUml<sup>-1</sup>[15]. These latter determinations were made in 124 patients from 95 independent families. Pearson's  $\chi^2$  and Fisher's Exact test were utilized in the heterogeneity tests using the SPSS program, version 12.

## Results and discussion

Table 1 presents the result of inv. 22 and inv. 1 in our patients, comparing them with series studied in 13 other countries, in a total of 2,509 individuals. The study of 2,093 severe haemophilia A patients described by Antonarakis *et al.* [4] was also considered, but since the series was a composite one including many centers and it was not possible to separate specific populations from the whole it was not listed in the Table. The frequency of inv. 22 found by them (42%) is however well within the range shown in Table 1 (39%-49% in 14 of the 19 series distributed along 14 countries listed there). The prevalences of inv. 1 varied from 0% to 8% in basically the same series and countries. Considering the different sample sizes and the variety of countries considered there is a remarkable homogeneity, no statistically significant differences between them being observed.

Results concerning the quantitative presence of inhibitors in haemophiliacs with or without inversions 22 and 1 of the present investigation are summarized in Table 2. Independently of their status the majority showed low titres, with only two patients (one with inv. 22 and the other without it) presenting a titre >5BU. The three carriers of inv. 1 did not show inhibitors.



Our data for the relationship between inv. 22 and the presence/absence of inhibitors were compared with those of eight other series, studied in Europe, Asia, and Latin America, in Table 3. Now there is considerable between-series heterogeneity, the percentage of patients with inv. 22 showing inhibitors varying all the way from 5% (Spain) to 51% (our data). Complete information on this matter is not available for another Brazilian study, but Figueiredo *et al.* [29] found only 13% of patients with inhibitors among 24 inv. 22 haemophiliacs with the severe form of the disease.

Therefore, as was already well emphasized by many authors [3, 5, 36-41] other factors besides inv. 22 influence the presence of anti-FVIII inhibitors. To illustrate this point we show information about differences in inhibition titres between carriers of the same inv. 22 inversion in two families studied by us (Table 4). The type of therapeutic agent used, the possible influence of the von Willebrand factor as an immuno-chaperone agent for FVIII [39-41], and the role of other characteristics of the genetic immunologic system of those affected [5, 36] should be considered in patients throughout the world to disentangle the environmental and genetic components of this phenomenon. We are presently starting an investigation about the third approach listed above.

## ***Acknowledgments***

We thank Ana M.C.B. Pereira for laboratory help, as well as the patients and HEMOCENTRO-RS's staff for agreeing to participate in the study and for logistical support. Funding was provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Institutos do Milênio and Apoio a Núcleos de Excelência Programs, and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul.

## References

- 1 Lakich D, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nature Genet* 1993; **5**:236-41.
- 2 Castaldo G, D'Argenio V, Nardiello P *et al.* Haemophilia A: molecular insights. *Clin Chem Lab Med* 2007; **45**:450-61.
- 3 Salviato R, Belvini D, Radossi P *et al.* F8 gene mutation profile and ITT response in a cohort of Italian haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia* 2007; **13**:361-72.
- 4 Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M *et al.* Factor VIII gene inversions in severe haemophilia A: results of an international consortium study. *Blood* 1995; **86**:2206-12.
- 5 Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia* 2006; **12**(Suppl. 6):15-22.
- 6 Roisenberg I, Morton NE. Genetic aspects of hemophilias A and B in Rio Grande do Sul, Brazil. *Hum Hered* 1971; **21**:97-107.
- 7 Alexandre COP, Roisenberg I. A genetic and demographic study of hemophilia A in Brazil. *Hum Hered* 1985; **35**:250-4.
- 8 Rieger A, Roisenberg I. Prevalence of factor VIII inhibitors in patients with hemophilia A in Brazil. *Thromb Haemost* 1999; **81**:475-6.
- 9 Simon D, Roisenberg I. Type 2N von Willebrand disease mutations in Brazilian individuals. *Haemophilia* 2004; **10**:473-6.
- 10 Lahiri DK, Nurnberger J. A rapid nonenzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucl Acids Res* 1991; **19**:5444.

- 11 Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 1988; **16**:1215.
- 12 Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD. Genotyping the haemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR. *Clin Chem* 2005; **51**:1154-58.
- 13 Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe haemophilia A. *Blood* 2002; **99**:168-74.
- 14 Kasper CK, Aledort LM, Counts RB *et al.* A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh* 1975; **34**:869-72.
- 15 Kasper CK. Laboratory tests for factor VIII inhibitors, their variation, significance and interpretation. *Blood Coagul and Fibrin* 1995; **2**:7-10.
- 16 Habart D, Kalabova D, Hrachovinova I, Vorlova Z. Significant prevalence of the intron 1 factor VIII gene inversion among patients with severe hemophilia A in the Czech Republic. *J Thromb Haemost* 2003; **1**:1323-4.
- 17 Andrikovics H, Klein I, Bors A, Nemes L, Marosi A, Váradi A, Tordai A. Analysis of large structural changes of the factor VIII gene, involving intron 1 and 22, in severe hemophilia A. *Haematologica* 2003; **88**:778-84.
- 18 Aquila M, Passino M, Lanza T, Bottini F, Boeri E, Bicocchi MP. Frequency of factor VIII intron 1 inversion in a cohort of severe haemophilia A Italian patients. *Haematologica* 2003; **88**:ELT17.
- 19 Salviato R, Belvini D, Radossi P, Tagariello G. Factor VIII intron 1 inversion: lower than expected prevalence in Italian haemophiliac severe patients. *Haemophilia* 2004; 194-6.

- 20 Riccardi F, Tagliaferri A, Mannotti C, Pattacini C, Neri TM. Intron factor VIII gene inversion in a population of Italian hemophilia A patients. *Blood* 2002; **100**:3432.
- 21 Tizzano EF, Domènech M, Altisent C, Tussel J, Baiget M. Inversions in the factor VIII gene in Spanish hemophilia A patients. *Blood* 1994; **83**:3826.
- 22 Tizzano EF, Cornet M, Baiget M. Inversion of intron 1 of the factor VIII gene for direct molecular diagnosis of haemophilia A. *Haematologica* 2003; **88**:118-20.
- 23 David D, Ventura C, Moreira I *et al.* The spectrum of mutations and molecular pathogenesis of hemophilia A in 181 Portuguese patients. *Haematologica* 2006; **91**:840-3.
- 24 Castaman G, Giacomelli SH, Ghiotto R *et al.* Spectrum of mutations in Albanian patients with haemophilia A: identification of ten novel mutations in the factor VIII gene. *Haemophilia* 2007; **13**:311-6.
- 25 Rastegar Lari G, Enayat MS, Arjang Z, Lavergne JM, Ala F. Identification of intron 1 and 22 inversion mutations in factor VIII gene of 124 Iranian families with severe haemophilia A. *Haemophilia* 2004; **10**:410-1.
- 26 Ahmed R, Kannan M, Choudhry VP, Saxena R. Mutation reports: intron 1 and 22 inversions in Indian haemophiliacs. *Ann Hematol* 2003; **82**:546-7.
- 27 Jayandharan G, Shaji RV, Baidya S, Nair SC, Chandy M, Srivastava A. Identification of factor VIII gene mutations in 101 patients with haemophilia A: mutation analysis by inversion screening and multiplex PCR and CSGE and molecular modelling of 10 novel missense substitutions. *Haemophilia* 2005; **11**:481-91.
- 28 Mantilla-Capacho JM, Beltrán-Miranda CP, Luna-Záizar H *et al.* Frequency of intron 1 and 22 inversions of factor VIII gene in Mexican patients with severe hemophilia A. *Am J Hematol* 2007; **82**:283-7.

- 29 Figueiredo MS, Tavella MH, Simões BP. Large DNA inversions, deletions, and *Taq* I site mutations in severe haemophilia A. *Hum Genet* 1994; **94**:473-8.
- 30 Soares RPS, Chamone DAF, Bydlowski SP. Factor VIII gene inversions and polymorphisms in Brazilian patients with haemophilia A: carrier detection and prenatal diagnosis. *Haemophilia* 2001; **7**:299-305.
- 31 Rossetti LC, Radic CP, Candela M *et al.* Sixteen novel hemophilia A causative mutations in the first Argentinian series of severe molecular defects. *Haematologica* 2007; **92**:842-5.
- 32 Laurie AD, Sheen CR, Hanrahan V, Smith MP, George PM. The molecular aetiology of haemophilia A in a New Zealand patient group. *Haemophilia* 2007; **13**:420-7.
- 33 Fernández-López O, García-Lozano J-R, Núñez-Vázquez R, Pérez-Garrido R, Núñez-Roldan A. The spectrum of mutations in southern Spanish patients with hemophilia A and identification of 28 novel mutations. *Haematologica* 2005; **90**:707-10.
- 34 Tagariello G, Belvini D, Salviato R, Are A, De Biasi E, Goodeve A, Davoli P. Experience of a single Italian center in genetic counseling for hemophilia: from linkage analysis to molecular diagnosis. *Haematologica* 2000; **85**:525-9.
- 35 Ghosh K, Shetty S, Kulkarni B *et al.* Development of inhibitors in patients with haemophilia from India. *Haemophilia* 2001; **7**:273-8.
- 36 Reipert BM, van den Helden PMW, Schwarz H-P, Hausl C. Mechanisms of action of immune tolerance induction against factor VIII in patients with congenital haemophilia A and factor VIII inhibitors. *Brit J Haematol* 2006; **136**:12-25.
- 37 Dasgupta S, Navarrete A-M, Delignat S *et al.* Immune response against therapeutic factor VIII in hemophilia A patients – a survey of probable risk factors. *Immunol Lett* 2007; **110**:23-8.

- 38 Gouw SC, van der Bom JG, Auerswald G *et al.* Recombinant versus plasma-derived factor VIII products and the development of inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood* 2007; **109**:4693-7.
- 39 Calvez T, Laurian Y, Goudemand J. Associations between type of product and inhibitors in previously untreated patients (PNPs) with severe hemophilia: switches and particular products can disturb analysis. *Blood* 2007; **110**:1073-4.
- 40 van der Bom JG, Gouw SC, van der Berg HM. Response. Plasma-derived or recombinant factor VIII products and inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia. *Blood* 2007; **110**:1074-5.
- 41 Delignat S, Dasgupta S, André S *et al.* Comparison of the immunogenicity of different therapeutic preparations of human factor VIII in the murine model of hemophilia A. *Haematologica* 2007; **92**:1423-6.

**Table 1.** Prevalence of introns 22 and 1 inversions in severe haemophiliacs from different regions of the world

Population	No. patients	Inv. 22 %	Inv. 1 %	References
Europe				
United Kingdom	209	45	2	[13]
Germany	753	45	2	[5]
Czech Republic	162	44	4	[16]
Hungary	104	52	0	[17]
Italy	20	40	5	[18]
	93	42	6	[20]
	293	41	2	[19]
Spain	102*	41	5	[21,22]
Portugal	135	54	2	[23]
Albania	19	10	0	[24]
Asia				
Iran	124	40	2	[25]
India	80	44	3	[26]
	89	56	2	[27]
Latin America				
Mexico	31	45	0 <sup>†</sup>	[28]
Brazil	49	49	NA	[29]
	33	39	NA	[30]
	107	46	3	Present study
Argentina	80	45	1	[31]
Oceania				
New Zealand	26	54	8	[32]

NA: Not available.

\*The inv. 1 prevalence was obtained in an independent series of 79 patients.

<sup>†</sup>Sixty-five patients were screened for inv. 1.

**Table 2.** Presence of introns 1 and 22 inversions and development of FVIII inhibitors

Inhibitors	Negative		Low titre		Total
	No.	%	No.	%	
Presence of inv1	3	100	-	0	3
Presence of inv22	21	49	22	51	43
Absence of inv1 or inv22	33	67	16	33	49
Total	57	60	38	40	95



**Table 3.** Relationship between inversion 22 and the presence/absence of FVIII inhibitors

Population	With inv.22 and with inhibitors (1)	With inv.22 and without inhibitors (2)	% inv.22 with inhibitors (1/1+2)	Without inv.22 and with inhibitors (3)	Without inv.22 and without inhibitors (4)	Total	References
Europe							
Spain	N 1	19		4	31	55	[33]
	% 2	35	5	7	56		
Italy	N 17	21		10	48	96	[34]
	% 18	22	45	10	50		
Asia							
Iran	N 9	40		6	67	122	[25]
	% 7	33	18	5	55		
India	N 4	46		3	36	89	[27]
	% 5	52	8	3	40		
	N 4	13		0	33	50	[35]
	% 8	26	23	0	66		
Latin America							
Mexico	N 3	4		2	5	14	[28]
	% 21	29	43	14	36		
Brazil	N 22	21		16	36	95	Present study
	% 23	22	51	17	38		
Argentina	N 5	37		11	38	91	[31]
	% 5	41	12	12	42		

Heterogeneity  $\chi^2$ : 78.9, 21 d.f., P=0.0000.

**Table 4.** Examples of patients with the same inversion 22 showing inhibitor status discordance

Identification	Present age	Treatment type	Inhibitor status
Family 1			
Proband	Deceased (born 1948)	Plasma Cryoprecipitate Purified FVIII	Negative
Brother 1	57	Plasma Cryoprecipitate Purified FVIII	Positive (5 BUml <sup>-1</sup> )
Brother 2	46	Plasma Cryoprecipitate Purified FVIII	Negative
Family 2			
Proband	Deceased (born 1988)	Purified FVIII	Negative
Brother 1	10	Purified FVIII	Positive (2 BUml <sup>-1</sup> )
Brother 2	8	Purified FVIII	Negative

**Capítulo 3. História natural de uma população de hemofílicos A graves do sul do Brasil, com ênfase no desenvolvimento de inibidores do Fator VIII**

Artigo a ser submetido para publicação na revista “Cadernos de Saúde Pública”.

História natural de uma população de hemofílicos A graves do sul do Brasil, com ênfase no desenvolvimento de inibidores do Fator VIII

Natural history of a population of southern Brazilian severe hemophiliacs, with emphasis in the development of Factor VIII inhibitors

*Leonardo Barbosa Leiria<sup>1</sup>, Israel Roisenberg<sup>1</sup>, Francisco Mauro Salzano<sup>1</sup>, Eliane Bandinelli<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.*

### **Correspondência**

*F.M. Salzano, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.*

**Abstract:**

A characterization of a sample of severe hemophilia A patients living in the state of Rio Grande do Sul that is being studied by our group for many years, with a special emphasis in the presence or absence of factor VIII inhibitors was made. The latter characteristic is the most important complication which occurs in the therapeutics of these patients. A total of 168 severe hemophiliacs were considered, examined in relation to the presence of inversions in introns 1 and 22, the dose of factor VIII administered, the type of product utilized, time of treatment with purified factor VIII, ethnic extraction, and age. Statistically significant associations between some of these factors and the risk of development of these inhibitors were observed, that however disappeared when a multiple regression logistic analysis was employed. The study, however, is important for a first approach to the problem, that will be investigated by us specially with relation to genetic factors in the immune system of these same patients.

Keywords: FVIII inhibitors, severe hemophilia A, hemophiliacs

## **Introdução**

A hemofilia A (HA) é uma doença hemorrágica com padrão de herança ligada ao X, caracterizada pela deficiência no fator VIII (FVIII) da via de coagulação ou na sua produção devido a mutações no gene do FVIII. A doença afeta cerca de 1 em cada 5000 nascimentos masculinos<sup>1-3</sup>. Dentre os tipos de hemofilia A (grave, moderado e leve), a forma grave é encontrada em cerca de metade dos pacientes, e desses cerca de 50% possuem uma mutação, uma inversão no intron 22 (Inv22) que leva à não produção do FVIII, sendo esta a mutação de maior frequência na HA grave, não sendo ela encontrada nas outras formas<sup>4-7</sup>. A produção de anticorpos contra o FVIII exógeno (aloanticorpos), cuja ampla maioria é pertencente à classe IgG, representa a maior complicação no tratamento desta doença, sobretudo na sua forma mais grave (FVIII <1%), pois leva à neutralização do FVIII infundido no paciente, acarretando uma diminuição na sua qualidade e expectativa de vida<sup>7</sup>. A incidência de inibidores em diferentes populações de hemofílicos A é muito ampla, variando de 5 a 30%, onde a maior parte é composta por pacientes com a forma grave, prevalências de 25-30%, sendo de 5% para as outras formas<sup>8-12</sup>. A presença de inibidores contra o FVIII em pacientes HA no Brasil foi estimada numa frequência em torno de 20%<sup>13</sup>. Segundo dados do Ministério da Saúde são gastos anualmente mais de US\$ 100 milhões de dólares com a importação de hemoderivados para cerca de 9 mil hemofílicos atendidos pelo Sistema Único de Saúde<sup>14</sup>.

Diversos trabalhos mostram que o risco de desenvolvimento de inibidores está relacionado com fatores genéticos e ambientais<sup>11,12,15-18</sup>. Dentre os fatores genéticos destacam-se alterações estruturais no gene do FVIII (genótipos de FVIII) e genes envolvidos na resposta imune. Cerca de 80% das alterações genéticas no gene do FVIII predispõe ao desenvolvimento de inibidores em 17-41% dos pacientes com HA<sup>11</sup>.

Mutações associadas com a ausência do produto gênico, como no caso de deleções e inversões, possuem um maior risco de seus portadores apresentarem inibidores<sup>11,19,20</sup>. Polimorfismos em genes relacionados com o sistema imune, como genes codificadores para citocinas (interleucina 10, IL-10) e fatores imunoreguladores como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) também estão relacionados com a presença de inibidores, sendo que esses fatores parecem ser mais importantes do que alterações estruturais no gene do fator VIII<sup>18,21</sup>.

Fatores ambientais como a dose de FVIII administrada, a idade da primeira exposição, a frequência de exposição, o hemoderivado utilizado e a atividade do produto são fatores de risco ao desenvolvimento de inibidores contra o FVIII<sup>11,16-18,22</sup>. Além disso, o tipo de FVIII utilizado no tratamento - purificado, altamente purificado, recombinante ou derivado de plasma - também é um fator de risco<sup>22-24</sup>.

Outros fatores, como a severidade da doença, o histórico familiar de inibidores e a idade dos pacientes, sua origem étnica, são fatores de risco ao desenvolvimento de inibidores contra FVIII<sup>11,16,18-21,25-26</sup>. Num estudo com irmandades<sup>19</sup>, o risco relativo foi de 3,2x maior para pacientes que apresentavam ao menos um irmão desenvolvendo inibidores; além disso, a incidência de inibidores em pacientes com irmandades é maior que nos casos esporádicos; e segundo alguns autores<sup>19,23</sup> a incidência de inibidores em pacientes de origem africana é duas vezes maior que em pacientes de origem européia.

O objetivo deste trabalho é descrever uma população de hemofílicos graves que vem sendo objeto de estudos de nosso grupo por muitos anos, considerando possíveis fatores que influenciariam no desenvolvimento de inibidores contra o FVIII.

## **Métodos**

### *Pacientes e aspectos éticos*

Foram estudados 168 pacientes com hemofilia A grave representantes de 136 famílias não aparentadas que são assistidos nas redes HEMOCENTRO do Rio Grande do Sul, Brasil. Todos os pacientes ou seus representantes legais assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido e aceitaram livremente participar deste estudo; e este foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A média de idade dos pacientes foi de  $23\pm 14$  anos (intervalo de 3-66 anos), sendo 91% dos pacientes de origem européia e 9% de origem africana ou mestiça.

### *Dosagens de inibidores contra o FVIII e estudos moleculares*

O sangue dos pacientes foi coletado por punção venosa e a partir dele foram realizados os ensaios de atividade para dosagens dos inibidores contra o FVIII segundo o método de ensaio Bethesda<sup>23</sup>, tendo como ponto de corte dosagens de inibidores  $<1$  UB/ml<sup>24</sup>. Para os estudos moleculares do FVIII foram realizadas as genotipagens das inversões do intron 1<sup>22</sup> e do intron 22<sup>24</sup>.

### *Análise estatística dos dados*

Foram coletados dados sobre a origem étnica dos pacientes, dose de FVIII recebida nos últimos três anos (2005-2007), tipo de hemoderivado utilizado desde o início do tratamento até hoje, tempo de tratamento, idade e presença de infecção viral por HIV (vírus da Imunodeficiência Humana), HCV (vírus da hepatite C), ou HBV (vírus da hepatite B). Para as análises de dados foram utilizados testes paramétricos e não paramétricos: o teste t, o teste de Mann-Whitney, o teste de Qui-quadrado e o teste Exato de Fisher, conforme a necessidade dos dados. Para se verificar a dependência do



desenvolvimento de inibidores com relação a fatores múltiplos de risco foi realizada uma análise por regressão logística. Todos os dados estatísticos foram desenvolvidos utilizando-se o programa SPSS 12.

### *Resultados e Discussão*

Na Tabela 1 estão apresentadas as principais características dos 168 pacientes. Desses 53 apresentaram inibidores contra o FVIII (31,5%) correspondendo a 49 famílias (36%). Formalmente, nas análises univariadas discriminadas na tabela ocorrem associações significativas com relação a: 1. Tipo de tratamento com crioprecipitado: 60% dos indivíduos que apresentaram inibidores fizeram o tratamento com crioprecipitado, enquanto 39% dos que não desenvolveram inibidores utilizaram este tratamento; 2. Dose e tempo de uso de FVIII purificado (probabilidade na significância estatística); e 3. Idade: a partir dos 3 anos de idade quanto maior a idade, maior a prevalência de inibidores. Entretanto, muitos dos tratamentos envolvem mais de um produto, e naturalmente, indivíduos mais velhos geralmente receberam mais doses terapêuticas do que os mais jovens.

A Tabela 2 fornece dados sobre os casos múltiplos que ocorreram nas famílias estudadas, relacionando-os com a presença ou ausência de inibidores. Foram dosados inibidores de mais de um indivíduo de 22 famílias. Com relação à presença de inibidores nas famílias, em 9 nenhum paciente apresentou inibidores (41%), em 2 todos os pacientes apresentaram inibidores (9%) e em 11 os dados de inibidores entre os familiares foram discordantes entre si (50%). Apenas 6 pacientes de famílias não aparentadas desenvolveram inibidores de alta resposta, (níveis de inibidores maiores que 5 UB/ml), sendo 3 casos esporádicos e 3 familiares. Um dos casos esporádicos apresentou ao longo do estudo, um decréscimo dos níveis de inibidores basais,

chegando esse a zero. Os três casos familiares apresentaram níveis de inibidores discordantes: um caso de discordância entre dois irmãos, outro de discordância entre os níveis de dois irmãos e um primo e o último em relação a dois irmãos e seu tio.

Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a presença da inversão do intron 22 e o desenvolvimento de inibidores nos pacientes mesmo quando separados por grupos étnicos (Tabela 3).

Quando se faz uma regressão logística considerando quatro das variáveis principais estudadas (Tabela 4) as diferenças se mostraram estatisticamente não significativas, ou seja, os fatores estudados, quando controlados entre si, não se apresentaram como fatores de risco significativos na predição do desenvolvimento de inibidores nos pacientes; o mesmo se refere quanto à presença de infecção viral crônica (HIV, HCV ou HBV).

Quando se trata do desenvolvimento de inibidores em pacientes com hemofilia A, especialmente com a forma grave, uma das grandes questões quanto aos inibidores é por que alguns pacientes com HA grave desenvolvem inibidores enquanto outros não. Como já mencionado, muitos fatores genéticos e ambientais estão relacionados com essa característica. Face ao mencionado, e considerando que muitos desses fatores de risco foram por nós avaliados, a pergunta é por que na análise global de nossa amostra as diferenças mostraram-se não significativas. Embora o tamanho amostral não seja pequeno (168 pacientes) é possível que devido a distribuições específicas das variáveis consideradas um número maior de pacientes tivesse de ser investigado, evitando a reunião de diferentes fatores de um só grupo. Adicionalmente, um enfoque que nos parece bastante promissor é o da investigação de fatores específicos relacionados ao sistema imune dos pacientes. O assunto é muito importante porque somente através da elucidação da relação herança/ambiente será possível ter uma profilaxia mais eficiente e

assim melhorar a qualidade de vida dos pacientes com hemofilia A que utilizam as terapias de reposição de fator.

## **Resumo**

Foi feita a caracterização de uma amostra de hemofílicos graves residentes no estado do Rio Grande do Sul que vem sendo estudada pela nossa equipe por muitos anos, com ênfase especial na presença ou não de inibidores do fator VIII, a maior complicação que ocorre na terapêutica desses pacientes. Foram considerados 168 pacientes com hemofilia A grave nos quais se examinou a presença das inversões dos introns 1 e 22, a dose do fator VIII administrada, o tipo de produto utilizado, o tempo de tratamento com o fator VIII purificado, a etnia e a idade dos pacientes. Foram observadas associações significantes entre alguns desses fatores e o risco de desenvolvimento de inibidores que, entretanto, desapareceram após uma análise de regressão logística múltipla. As possíveis razões para esses achados foram apresentadas. O estudo serve, no entanto, como uma primeira aproximação do problema, que continuará a ser investigado por nós com relação, especialmente, a fatores genéticos no sistema imune desses pacientes.

## **Colaboradores**

L. B. Leiria foi responsável pelo desenvolvimento da parte experimental e das análises estatísticas posteriores, sob a orientação de I. Roisenberg e E. Bandinelli. Todos os autores foram responsáveis pela elaboração e redação do texto. F. M. Salzano contribuiu também na coordenação final.

## **Agradecimentos**

Agradecemos a Ana M. C. B. Pereira por auxílio no laboratório, a Sidia M. Callegar-Jacques por assistência na parte estatística, bem como aos pacientes e profissionais do HEMOCENTRO-RS por concordarem em participar do estudo e por apoio logístico. O suporte financeiro foi fornecido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Programas Institutos do Milênio e Apoio a Núcleos de Excelência e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul.

## Referências

1. Hoyer IW. Hemophilia A . N Engl J Med 1994; 330:38-47.
2. Kembball-Cook G, Tuddenham EGD, Wacey AI. The factor VIII structure and mutation resource site: HAMSTeRS. Nucleic Acids Res 1998; 26:216-9.
3. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J and International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001; 409:860-921.
4. Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M and a consortium of 65 international authors. Factor VIII gene inversions in severe haemophilia A – results of an international consortium study. *Blood* 1995; 86:2206-2212.
5. Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nature Genet* 1993;5:236-241.
6. Scandella D, Mattingly M, Prescott R. A recombinant factor VIII A2 domain polypeptide quantitatively neutralizes human inhibitor antibodies that bind to A2. *Blood* 1993; 82:1767-75.
7. Leiria LB, Roinsenber I, Salzano FM, Bandinelli E. Introns 1 and 22 inversions and factorVIII inhibitors in patients with severe haemophilia A in southern Brazil. *Haemophilia* 2008 (submitted).
8. Lusher JM, Arkin S, Abildgaard CF, Schwartz RS. Recombinant factor VIII for the treatment of previously untreated patients with haemophilia A – safety, efficacy and development of inhibitors. N Eng J Med. 1993; 328:453-9.
9. Kreuz W, Becker S, Lenz E, Martinaz-Saquer I, Escuriola-Ettingshausen C et al. Factor VIII inhibitors in patients with haemophilia A: epidemiology of inhibitor

development and induction of immune tolerance for factor VIII. *Semin Thromb Haemost* 1995; 21:382-9.

10. Scharrer I, Neutzling O. Incidence of inhibitors in haemophiliacs: A review of literature. *Blood Coagulation Fibrinolysis* 1993; 4:753-8.

11. Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors of inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia* 2006; 12:15-22.

12. Oldenburg J, El-Maarri O, Schwaab R. Inhibitor development in correlation to factor VIII genotypes. *Haemophilia* 2002; 8:23-29.

13. Rieger A, Roisenberg I. Prevalence of factor VIII inhibitors in patients with hemophilia A in Brazil *Thromb Haemost*. 1999; 81:475-6.

14. Ministério da Saúde. Sangue e hemoderivados. *Revista Saúde Brasil*, Ed. 104; Janeiro de 2005. <http://portal.saude.gov.br/saude>. Acesso em Novembro de 2007.

15. Oldenburg J, Schorder J, Brackmann HH, Muller-Reible, Schwaab R, Tuddenham E. Environmental and genetic factors influencing inhibitors development. *Semin Hematol* 2004; 41:82-8.

16. Hay CRM. The epidemiology of factor VIII inhibitors. *Haemophilia* 2006; 12:23-29.

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

18. Scharrer I, Bray GL, Neutzling O. Incidence of inhibitors in haemophilia A patients - a review of recent studies of recombinant and plasma-derived factor viii concentrates. *Haemophilia* 1999; 5:145-54.

19. Astermark J, Oldenburg J, Escobar M, White GC, Berntorp E. The malmo international brother study –genetics defects and inhibitor development in siblings with severe hemophilia A. *Haematologica* 2005; 90:924-930.

20. Bowen DJ. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Mol Pathol* 2002; 55:1-18.
21. Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, Lefvert AK. Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1 beta and IL4 genes are associated with development in patients with hemophilia A. *Blood* 2006; 107:3167-72.
22. Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe haemophilia A. *Blood* 2002; 99:168-74.
23. Kasper CK. Laboratory tests for factor VIII inhibitors, their variation, significance and interpretation. *Blood Coagul and Fibrin* 1995; 2:7-10.
24. Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD. Genotyping the haemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR. *Clin Chem* 2005; 51:1154-58.
25. Nilsson IM, Lamme, S. On acquired haemophilia A - a survey of 11 cases. *Acta Med Scand* 1993; 208:5-12.
26. Penner JA. Haemophilic patients with inhibitors to factor VIII or IX: variables affecting treatment response. *Haemophilia* 2001; 7:103-108.



Tabela 1

Características básicas dos pacientes e sua relação com a presença ou ausência de inibidores

<b>Características</b>	<b>Presença de Inibidores</b>	<b>Ausência de Inibidores</b>	<b>Total</b>	<b>Probabilidade (P)</b>	<b>Teste</b>
<b>Etnia</b>					
Eurodescendentes	47	106	153	0,999	Fisher
Afrodescendentes	5	10	15		
<b>Alterações no gene do FVIII<sup>1</sup></b>					
Inv22	24	50	74	0,959	Qui-quadrado
Inv1	0	6	6		
Sem Inv1 ou Inv22	29	59	88		
<b>Tipo de tratamento utilizado (+/-)</b>					
Sangue ou plasma	11/41	21/95	168	0,800	Qui-quadrado
Crioprecipitado	31/21	45/71	168	0,019	Qui-quadrado
FVIII/FvW	30/22	56/60	168	0,336	Qui-quadrado
<b>Dose média de fator VIII (UI/kg/ml) purificado<sup>1,2</sup></b>					
<20	8	26	34	0,056	Mann-Whitney
20-40	7	17	24		
40-60	6	13	19		
60-80	12	22	34		
80-100	5	14	19		
100-120	3	7	10		
120-140	2	1	3		
140-160	1	3	4		
160-180	0	1	1		
180-200	3	3	6		
>200	5	9	14		
<b>Idade (anos)<sup>1</sup></b>					
3-5	2	9	11	0,034	Teste t
5-10	3	19	22		
10-15	13	17	30		
15-20	5	16	21		
20-25	8	12	20		
25-30	5	11	16		
30-40	4	20	24		
>40	12	12	24		

Tabela 1 Cont

Características básicas dos pacientes e sua relação com a presença ausência de inibidores

Características	Presença de inibidores	Ausência de inibidores	Total	Probabilidade (P)	Teste
Tempo de tratamento com FVIII purificado (anos) <sup>1</sup>					
3-5	1	8	9	0,016	Teste t
5-10	11	28	39		
10-15	35	79	114		
15-20	5	1	6		
Presença de infecção viral crônica (HIV, HBV ou HCV)					
Sim	8	16	24	0,973	Qui-quadrado
Não	44	100	144		

<sup>1</sup> Dados utilizados na Regressão Logística.<sup>2</sup> Dose média de fator VIII infundida nos últimos três anos.

Tabela 2

Informação sobre casos múltiplos em uma mesma família e sobre a presença ou ausência de inibidores			
Geral	Presença de inibidores	Tipo de caso	
		Familiar	Esporádico
	Número de famílias	22	27
	Número de pacientes	32	27
Familiar	Detalhamento	Nº de famílias	Nº de pacientes testados por irmandade
	1. Famílias sem a presença de inibidores	4	3
		5	2
	2. Famílias com todos os pacientes com inibidores	2	2
	3. Discordância entre familiares	4	3
		1	4
		6	2

Tabela 3

---

Frequência das inversões dos introns 1 e 22 nos pacientes classificados por etnia e presença ou ausência de inibidores

---

<b>Característica</b>	<b>Euro- descendentes</b>		<b>Afro-descendentes</b>	
	<b>Com Inib</b>	<b>Sem Inib</b>	<b>Com Inib</b>	<b>Sem Inib</b>
Inv1	0	6	0	0
Inv22	22	46	2	4
Sem Inv1 ou Inv22	25	54	3	6

---

\*Qui-quadrado P=0,930.

Tabela 4

Associação entre a presença ou ausência de inibidores com as diversas variáveis controlada pelas covariantes<sup>1,2</sup>

Fator	Probabilidade (P)	Odds ratio (OR)	Intervalo de Confiança (IC OR, 95%)	
			Menor	Maior
Inv22	0,937	1,029	0,512	2,065
Idade	0,090	0,281	0,65	1,219
Dose FVIII (<30 U/kg/ml)	-----	1	-----	-----
Dose FVIII (30-60 U/kg/ml)	0,579	1,349	0,468	3,887
Dose FVIII (>60 U/kg/ml)	0,194	1,727	0,757	3,936
Tempo de uso do fator VIII em anos	0,466	0,659	0,215	2,022
Tratamento com crioprecipitado	0,108	1,802	0,878	3,700

<sup>1</sup>Covariantes estudadas: presença/ausência de inv22, idade dos pacientes, dose de FVIII purificado, tempo de uso de FVIII purificado em anos, uso ou não de crioprecipitado (Crio) no tratamento.

<sup>2</sup>Regressão Logística: P=0,293.

## Discussão

### *As técnicas empregadas*

Figueiredo *et al.*(1994) e Soares *et al.* 2001 foram os primeiros a descrever a frequência da inv22 em pacientes com HA grave no Brasil, utilizando a técnica de *Southern blotting*. Em 1998, Liu *et al.* desenvolveram uma técnica de detecção baseada na amplificação de fragmentos de DNA maiores do que 10 kb (LD-PCR) a partir de ciclos múltiplos de anelamento e extensão (*subcycling*). Essa técnica foi utilizada no início de nosso trabalho, porém com a mesma há dificuldades na amplificação e a necessidade de condições muito específicas para se obter um sucesso e um diagnóstico do material molecular correto.

Em 2005 Rossetti *et al.* desenvolveram uma técnica de PCR inverso (I-PCR), que se constitui em uma forma mais rápida, eficiente e de menor custo na detecção dessa inversão e que foi utilizada nesse trabalho, sendo que todos os pacientes testados anteriormente com a técnica descrita por Liu *et al.* (1998) foram confirmados. Bagnall *et al.* (2006) desenvolveram uma técnica baseada na descrita por Liu *et al.* (1998), também analisando amplicons de grande tamanho (10,11,12 kbs), porém capaz de detectar e discriminar os subtipos dessa inversão (Int22h). Essa técnica não foi utilizada devido ao seu custo mais elevado e porque na inv22 os dois produtos (proximal e distal) levam à não produção da proteína, não havendo diferenças entre elas no fenótipo final dos pacientes.

A técnica utilizada na quantificação dos inibidores foi baseada no método Bethesda, e foi descrita por Kasper *et al.* (1975) e Kasper (1995); o ponto de corte escolhido para a presença de inibidores foi de 1 UB/ml, considerado o melhor ponto de corte para evitar falsos positivos. Outros trabalhos utilizam variações nesta técnica

descrita e pontos de corte diferentes. Diferenças na metodologia empregada na coleta, detecção e o tipo de estudo realizado podem explicar algumas discrepâncias entre os resultados observados nos trabalhos publicados.

#### *A hemofilia A e suas complicações*

A hemofilia A é a segunda doença genética hemorrágica mais freqüente na população humana, e metade dos pacientes acometidos por ela apresentam a forma mais grave da doença, acarretando dificuldades físicas e psicológicas. Essas induzem danos articulares causados pelas hemartroses e hemorragias por traumas em geral, sendo a reposição do FVIII a forma de tratamento mais eficiente. Porém alguns pacientes, quando submetidos à infusão de FVIII acabam desenvolvendo anticorpos contra esse fator (inibidores), dificultando a ação terapêutica. Muitos fatores genéticos e ambientais foram descritos como fatores de risco à essa predisposição (Dasgupta *et al.*, 2007). Dentre os fatores genéticos estariam grandes inversões e deleções. Duas inversões (inv1 e inv22) ocorrem numa parcela considerável dos hemofílicos graves despertando um grande interesse para a sua detecção. Além disso, estudos iniciais mostraram que a inversão mais freqüente (inv22) poderia ser um fator de risco ao desenvolvimento de inibidores; entretanto, trabalhos recentes não encontram tal associação, como foi relatado nos capítulos 2 e 3.

No capítulo 2 é estabelecida a freqüência dessas inversões na amostra estudada e realizada uma comparação com os principais trabalhos referentes à freqüência das mesmas e sua associação ao desenvolvimento de inibidores. Como foi demonstrado, as populações apresentam freqüências médias muito próximas e não associadas com o desenvolvimento de inibidores, apesar de pacientes com a inversão possuírem uma maior freqüência, em média, desses inibidores.

Outros fatores de risco foram estudados (capítulo 3), tais como, a dose de FVIII recebida, o tempo de seu uso, o grupo étnico, a utilização de determinados hemoderivados e a idade dos pacientes.

A literatura registra que pacientes não euro-descendentes quando comparados com euro-descendentes apresentam títulos mais elevados e frequência maior de inibidores. Porém, em nossa amostra isso não ocorreu, não sendo as diferenças significativas. Um estudo brasileiro sobre a epidemiologia dos inibidores em pacientes com HA mostrou que o grupo composto por euro-descendentes apresentava uma frequência de inibidores maior que no grupo de afro-descendentes (Rieger & Roisenberg, 1999) e que pacientes das regiões sul e sudeste (regiões de colonização predominantemente européia) apresentavam uma maior incidência de inibidores que os pacientes das demais regiões do Brasil. Uma possível explicação para essa diferença entre a população brasileira e as demais, é que nossa população é miscigenada, e mesmo apresentando características externas européias, os fatores imunogenéticos relacionados com o risco de inibidores de origem africana estariam presentes nessa população aparentemente caucasóide. Por outro lado, o baixo número amostral de pacientes de origem não-européia de nossa amostra pode estar mascarando as diferenças existentes entre essas duas populações no Rio Grande do Sul.

No Brasil, até o momento, não é utilizado como terapia de reposição o fator VIII produzido de forma recombinante, sendo utilizados apenas hemoderivados produzidos a partir de plasma humano purificado. Nos Estados Unidos e em países europeus é comum a utilização do Fator VIII recombinante nas clínicas de hemoterapia. Muito se discute a respeito da imunogenicidade do fator FVIII recombinante frente aos derivados de plasma ou menos purificados. Muitos autores defendem que moléculas presentes em hemoderivados produzidos a partir de plasma humano seriam menos imunogênicas que



hemoderivados de fatores VIII altamente purificados ou recombinantes. Nesse modelo, pacientes expostos exclusivamente a fatores derivados de plasma apresentariam em média frequências menores de anticorpos e inibidores de baixo título. Note-se, no entanto, que a nossa amostra apresenta uma frequência de inibidores mais elevada do que as de populações que utilizam o FVIII recombinante, mas nossos pacientes apresentaram predominantemente inibidores de baixo título, sendo que em apenas 4 famílias os pacientes apresentaram inibidores de alta resposta. Isto contrasta com os resultados dos outros países, nos quais a frequência de inibidores de alta resposta é elevada.

Os primeiros contatos com o FVIII (50 primeiras doses) estão diretamente relacionados com a produção de inibidores nos pacientes. Em estudos com hemofilia moderada, doses iniciais de FVIII na infância são fatores de risco para o desenvolvimento de inibidores, e em inibidores de baixo título eles desaparecem à medida que aumenta a frequência do tratamento. Doses profiláticas frequentes teriam um menor risco de desenvolvimento de inibidores que doses recebidas apenas quando existe o trauma. Não foram registrados em nossa amostra os primeiros contatos com o tratamento, pois em hemofílicos graves normalmente os pacientes são diagnosticados nos primeiros meses de vida. Porém o tempo de uso do FVIII e a idade dos pacientes estariam indiretamente relacionadas com esse fator de risco.

Muitas questões ainda estão por resolver quanto à produção de inibidores do FVIII: por que alguns pacientes desenvolvem inibidores e outros não? por que gêmeos monozigóticos e/ou irmandades com a mesma mutação apresentam discrepâncias quanto à presença de inibidores, apesar de receberem o mesmo tratamento? por que um paciente que recebe continuamente FVIII apresenta inibidores de títulos baixos por um curto período de tempo, enquanto outros não os apresentam ou apresentam títulos altos?

Todas essas questões e os mecanismos que envolvem o desenvolvimento dos inibidores ainda não estão claros, sendo necessários mais estudos para o melhor entendimento dessa principal complicação na qualidade de vida dos pacientes graves.

## **Conclusão Final e Perspectivas**

A detecção da *inv22* e *inv1* nos pacientes é importante para o aconselhamento genético, porém com relação à produção de anticorpos contra o FVIII essas alterações estruturais parecem não influenciar no risco. Fatores não genéticos como a dose e o tipo do fator, bem como a idade dos pacientes, parecem influenciar no desenvolvimento de inibidores.

Como perspectivas para o estudo dos pacientes com HA podem-se mencionar a busca por outras mutações no gene do FVIII candidatas a influenciarem o desenvolvimento de inibidores e o estudo de fatores de risco imunogenéticos, como genes reguladores da resposta imune (IL-10, TNF- $\alpha$ ) e ambientais, como a idade inicial de tratamento.

## Referências Bibliográficas

- Acquila M., Pasino M, Santoro CT, Lanza T, Molinari AC, Bottini F & Biccocchi MP (2003a) Germ-line origin of intron 1 inversion in two haemophilia A families. *Haemophilia* 9:717–720.
- Acquila M, Passino M, Lanza T, Bottini F, Boeri E, Biccocchi MP (2003b) Frequency of factor VIII intron 1 inversion in a cohort of severe haemophilia A Italian patients. *Haematologica*; 88:ELT17.
- Aggeler PM, White SC, Glendening MB, Page EW, Leake TB & Bates G (1952) Plasma thromboplastin component (PTC) deficiency: a new disease reembling haemophilia. *Proc Soc Exp Med* 70:692-694.
- Alexandre CO & Roisenberg I (1985) A genetic and demographic study of hemophilia A in Brazil. *Hum Hered* 35:250-254.
- Algiman M, Dietrich G, Nydegger UE, Boieldieu D, Sultan Y & Kazatchkine MD (1992) Natural antibodies to factor VIII (anti-hemophilic factor) in healthy individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89:3795-3799.
- Aly, AM.& Hoyer, LW (1992) Factor VIII-East Hartford (arginine1689 to cysteine) has procoagulant activity when separated from von Willebrand factor. *J. Clin. Invest.* 89:1382-1387.
- Aly A M, Higuchi M, Kasper,CK, Kazazian HH, Antonarakis SE, Hoyer LW (1992) Hemophilia A due to mutations that create new N-glycosylation sites. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89: 4933-4937.

- Antonarakis SS, and a Consortium of 65 international authors (1995) Factor VIII gene inversions in severe haemophilia A – results of an international consortium study. *Blood* 86:2206-2212.
- Astermark J, Oldenburg J, Escobar M, White GC & Berntorp E (2005) Genetic defects and inhibitor development in siblings with severe haemophilia A. *Haematologica* 90:924-930.
- Bagnall RD, Waseem N, Green, PM & Giannelli F (1998) Mutation analysis and genetic service: the construction and use of national confidential databases of mutations and pedigrees. *Genet Test* 1:181-8.
- Bagnall RD, Waseem N, Green, PM & Giannelli F (2002) Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe haemophilia A. *Blood* 99:168-174.
- Bagnall RD, Giannelli F & Green PM (2005) Polymorphism and hemophilia A causing inversions in distal Xq28: a complex picture. *J Thromb Haemost.* 3:2598-9.
- Bagnall RD, Giannelli F & Green PM (2006) Int22h-related inversions causing hemophilia A: a novel insight into their origin and a new more discriminant PCR test for their detection. *J Thromb Haemost.* 4:591-8.
- Biggs R, Douglas AS, Macfarlane RG, Dacie JV, Pitney WR, Merske Y (1952) Christmas disease: a condition previously mistaken for haemophilia. *Br Med J* 27:1378-82.
- Bishop P & Lawson J (2004) Recombinant biologics for treatment of bleeding disorders. *Nature Reviews* 3:684-94.
- Bowen DJ (2002) Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Mol Pathol* 55:1-18.

- Bowen DJ & Keeney S (2003) Unleashing the long pcr for detection of the intron 22 inversion of the factor VIII gene in severe haemophilia A. *Thromb Haemost* 89:201-202.
- Brinke A, Tagliavacca L, Naylor J, Green P, Giangrande P & Giannelli F (1996) Two chimaeric transcription units result from an inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene and a region reportedly affected by reciprocal translocations in T-cell leukaemia. *Hum. Molec. Genet* 5: 1945-1951.
- Broze GJ (1995) Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. *Ann Rev Med* 46:103-112.
- Collen D (1999) The plasminogen (fibrinolytic) system. *Thromb haemost* 82:259-70.
- Da Costa TD (2004) Análise das mutações G20210a no gene da protrombina e FV Leidein no gene do Fator V em pacientes com hemofilia A. Trabalho de Conclusão de Curso - Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.
- Dahlbäck B (2000) Blood coagulation. *The Lancet* 355:1627-1632.
- Dasgupta S, Navarrete AM, Delignat S, Wootla B, Andre S et al. (2007) Immune response against therapeutic factor viii in hemophilia A patients – a survey of probable risks factors. *Immunology Letters* 110:23-28.
- Escola De Medicina - Universidade De Washington - A "Ribbon Diagram" of the structure of the haemophilia domain of human factor viii, <http://Depts.Washington.Edu/Mednews/Research/Hemophilia.Html>. Acesso em Março de 2005.
- Enzyme Research Laboratories Co., Global Coag – Reino Unido – Coagulation Cascade, <http://www.enzymeresearch.co.uk/coag.htm>. Acesso em Março de 2005.

- 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 Nat Acad Sci USA* 79:7200-7204.
- Fay PJ (1999) Regulation of Factor VIIIa in the intrinsic factor Xase. *Thrombosis and Haemostasis* 82(2):193-200.
- Figueiredo MS, Tavella MH, Simões BP (1994) Large DNA inversions, deletions, and *Taq* I site mutations in severe haemophilia A. *Hum Genet* 94:473-8.
- Forbes CD & Madhok R (1991) Genetic disorders of blood coagulation: clinical presentation and management. In: Forbes CD & Madhok R (eds) *Disorders of Haemostasis*. 2 ed. W.B. Saunders, Philadelphia, pp 141-202.
- Freije D & Schlessinger D (1992) A 1.6-Mb contig of yeast artificial chromosomes around the human factor VIII gene reveals three regions homologous to probes for the DXS115 locus and two for the DXYS64 locus. *Am J Hum Genet* 51:66-80.
- Gilbert MS (1981) Haemophilic athropathy: an overview. In: Seligsohn U, Rimon A & Horoszowski H (eds) *Haemophilia*. 2 ed. Alan R. Liss, New York, pp 157-162.
- Gill JC (1999) The role of genetics in inhibitor formation. *Thrombosis and Haemostasis* 82(2):500-5004.
- Gitscheir J, Wood WI & Goralka TM (1984) Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 312:326-330.
- Habart D, Kalabova D, Hrachovinova I, Vorlova Z (2003) Significant prevalence of the intron 1 factor VIII gene inversion among patients with severe hemophilia A in the Czech Republic. *J Thromb Haemost* 1:1323-4.
- Hamsters - The Haemophilia A Mutation, Structure, Test And Resource Site, <http://Europium.Csc.Mrc.Ac.Uk/Webpages/Main/Main.htm>.

- Hettasch JM & Greenberg CS (1998) Fibrin Formation and Stabilization In Loscalzo J & Schafer AI (eds) Thrombosis and hemorrhage. Williams & Wilkins. Baltimore pp: 129-154.
- Hoffman M (2003a) A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. Blood Rev 17 suppl 1:S1-5.
- Hoffman M (2003b) Remodeling the blood coagulation cascade. J Thromb Thrombolysis 16:17-20.
- Hoffman M & Monroe DM (2001) A cell-based model of hemostasis. Thromb Haemost 85:958-65.
- Hoyer LW (1994) Haemophilia A. N Engl J Med 330:38-47.
- Hoyer LW (1995) Why do so many haemophilia A patients develop inhibitor? Brit J Haem 90:498-501.
- Jacquemin MG & Saint-Remy JM (1998) Factor VIII immunogenicity. Haemophilia 4:552-557.
- Kasper CK, Aledort LM, Counts RB *et al* (1975) A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh* 34:869-72.
- Kasper CK. (1995) Laboratory tests for factor VIII inhibitors, their variation, significance and interpretation Blood Coagul and Fibrin 2:7-10.
- Kaufman RJ (1992) Biological regulation of factor viii activity. Ann Rev Med 43:325-339.
- Kenwrick S, Levinson B, Taylor S, Shapiro A. & Gitschier J (1992) Isolation and sequence of two genes associated with a CpG island 5-prime of the factor VIII gene. Hum Molec Genet 1:179-186.



- Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE & Gitschier J (1993) Inversions disrupting the factor viii gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nature Genet* 5:236-241.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J and a International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.
- 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.
- Leuer M, Oldenburg J, Lavergne J, Ludwig M, Fregin A, Eigel A, Ljung R, Goodeve A, Peake I. & Olek K (2001) Somatic Mosaicism in Hemophilia A: A Fairly Common Event. *Am J Hum Genet* 69:75–87.
- Levinson B, Kenwick S, Lakich D, Hammonds G & Gitschier J (1990) A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. *Genomics* 7: 1-11.
- Liu, Q & Sommer SS (1998) Subcycling-pcr for multiplex long-distance amplification of regions with high and low Gc content: application to the inversion hotspot in the factor viii gene. *Biotechniques* 25:1022-1028.
- Liu Q, Nozari G & Sommer SS (1998) Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in haemophilia A. *Blood* 92:1945-1951.
- Ljung R, Petrini P, Lindgren AC, Tengrom L & Nilsson IM (1992) Factor VIII and factor IX inhibitors in haemophilics. *Lancet* 339:15-50.
- Lusher JM, Arkin S, Abildgaard CF & Schwartz RS (1993) Recombinant factor VIII for the treatment of previously untreated patients with haemophilia A – safety, efficacy and development of inhibitors. *N Eng J Med* 328:453-459.

- Marcus, AJ & Safier LB (1993) Thromboregulation multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *Faseb Journal* 7:516-522.
- Mondorf W, Ehrenforth S, Vigh Z, Last J, Tippmann G, Kreuz W & Scharrer, I (1994) Screening of FVIII:C antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Vox Sanguinis* 66:8-13.
- Naylor JA, Green PM, Montandon AJ, Rizza CR, Giannelli F (1991) Detection of three novel mutations in two haemophilia A patients by rapid screening of whole essential region of factor VIII gene. *Lancet* 337:635-639.
- Naylor JA, Green PM, Rizza CR & Giannelli F (1992) Factor VIII gene explains all cases of haemophilia A. *Lancet* 340:1066-1067.
- Naylor JA, Green PM, Rizza CR & Giannelli, F (1993) Analysis of factor VIII mRNA reveals defects in everyone of 28 haemophilia A patients. *Hum Molec Genet* 2:11-17.
- Naylor JA, Nuck D, Green P, Williamson H, Bentley D & Giannelli F (1995) Investigation of the factor VIII intron 22 repeated region (int22h) and the associated inversion junctions. *Hum Mol Genet* 4:217-24.
- Nilsson, IM & Lamme, S (1993) On acquired haemophilia A - a survey of 11 cases. *Acta Med Scand* 208:5-12.
- Nilsson IM (1994). Factor VIII inhibitor treatment - Immune tolerance *Semin.Hematol.* 31:44-48.
- Oldenburg J, Rost S, El-Maarri O, Leuer M, Olek K, Muller CR. & Schwaab R (2000) De novo factor VIII gene intron 22 inversion in a female carrier presents as a somatic mosaicism. *Blood* 96(8):2905-2906.

- Opal SM & Esmon CT (2003) Bench-to-bedside review: functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis. *Critical Care* 7:23-38.
- Patterson M, Gitschier J, Bloomfield J, Bell M, Dorkins H, Froster-Iskenius U, Sommer S, Sobell J, Schaid D, Thibodeau S & Davies KE (1989) An intronic region within the human factor VIII gene is duplicated within Xq28 and is homologous to the polymorphic locus DXS115 (767). *Am. J Hum Genet* 44: 679-685.
- Pavlovsky A (1947) A contribution to the pathogenesis of haemophilia. *Blood* 2:185-191.
- Peake I (1995) Molecular genetics and counselling in haemophilia. *Thromb Haemost* 74:40-4.
- Penner JA (2001) Haemophilic patients with inhibitors to factor VIII or IX: variables affecting treatment response. *Haemophilia* 7:103-108.
- Peyvandi F, Jayandharan G, Chandy MA, Srivastava A, Nakaya SM, Johnson MJ, Thompson AR, Goodeve A, Garagiola I & Lavoretano, S (2006) Genetic diagnosis of haemophilia and other inherited bleeding disorders. *Haemophilia* 12:82–89.
- Rezende SM, Fujimoto DE, Daldegan MB & Thomas S (2005) Manual de tratamento das coagulopatias hereditária. 1ª ed. Ministério da Saúde. Brasília Df, 76 pp.
- Rieger A (1996) Aspectos genéticos e epidemiológicos dos inibidores na hemofilia A. Dissertação de Mestrado – Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.
- Rieger A & Roisenberg I (1999) Prevalence of factor VIII inhibitors in patients with hemophilia A in Brazil. *Thromb Haemost* 81:475-476.

- Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D, Platzer M, Howell GR, Burrows C, Bird CP, Frankish A, Lovell FL, Howe KL, Ashurst JL, Fulton RS et al. (2005) The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* 434: 325–37.
- Rossetti LC, Goodeve A, Larripa IB & De Brasi CD (2004) Homeologous recombination between alusx-sequences as a cause of haemophilia. *Hum Mutat* 24:440-445.
- Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD (2005) Genotyping the haemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR. *Clin Chem* 51:1154-58.
- Rossetti LC, Radic CP, Candela M *et al.* Sixteen novel hemophilia A causative mutations in the first Argentinian series of severe molecular defects. *Haematologica* 2007; 92:842-5.
- Scandella D, Mattingly M, Prescott R (1993) A recombinant factor VIII A2 domain polypeptide quantitatively neutralizes human inhibitor antibodies that bind to A2. *Blood* 82:1767-1775.
- Schulman E & Smith CH (1952) Hemorrhagic disease in an infant due to deficiency of a previously undescribed coagulation factor. *Am J Dis Child* 84:758-760.
- Soares RPS, Chamone 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.
- Thompson AR, Goodeve A, Garagiola I & Lavoretano, S (2006) Genetic diagnosis of haemophilia and other inherited bleeding disorders. *Haemophilia* 12:82–89.
- Tizzano E, Vencesla A, Cornet M, Baena M & Baiget M (2003) Inversion of intron 1 of the factor viii gene for direct molecular diagnosis of haemophilia A. *Haematologica* 88:118–121.

- Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, Sultzman LA, Buecker JL, Pittman DD, Kaufman RJ, Brow F, Shoemaker C, Orr EC *et al* (1984) Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature* 312:342-7.
- Tuddenham EGD & Cooper, DN (1994a) Factor VIII and hemophilia A. *Oxford Mon Med Genet* 25:19-76.
- Tuddenham EGD & Cooper DN (1994b) The molecular genetics of hemostasis and its inherited disorders. Oxford University, New York, 436pp.
- Tuddenham EG & Mcvey JH (1998) The genetic basis of inhibitor development in hemophilia A. *Hemophilia* 4:543-545.
- Vaughan DE & Declerick PJ (1998) Fibrinolysis and its regulation. In Loscalzo J & Schafer Ai (eds) *Thrombosis and hemorrhage*. Williams & Wilkins Baltimore pp:155-70.
- Vehar GA, Key B, Eaton D, Rodriguez H, O'Brien DP, Rotblat F, Oppermann H, Keck R, Wood WI & Harkins RN (1984) Structure of human factor VIII. *Nature* 312:337-342.

## **Apêndices**

**1. Seguimento**

**2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

**3. Ficha Clínica dos Pacientes**

## Apêndice 1. Seguimento

Após a finalização das análises e do texto do primeiro artigo (capítulo 2) foram obtidos novos dados e feitas algumas comparações adicionais como segue.

Foram estudados 229 pacientes com hemofilia A grave, representando 158 famílias residentes no Rio Grande do Sul. A média de idade foi de  $23\pm 14$  anos (IC:1-66 anos) e aproximadamente 90% da amostra está representada por pacientes de origem europeia, os outros 10% sendo formada por indivíduos de origem não-europeia ou miscigenada. Quanto ao histórico familiar (presença de hemofilia nas últimas 3 gerações), 85 famílias (54%) apresentavam apenas um paciente com hemofilia A (casos esporádicos), as demais sendo compostas por mais de um indivíduo afetado dentro de cada família (46%).

Nas famílias de euro-descendentes 26 casos isolados apresentaram a Inv22, 1 caso a Inv1 e outros 47 não apresentaram nenhuma delas. Já nas famílias de origem não-europeia, os casos isolados foram de 7, zero e 4, respectivamente.

Quando o histórico familiar é comparado com a presença das inversões cerca de 35% dos pacientes com a inversão do intron 22 são casos esporádicos. Este dado está de acordo com os encontrados nas populações da Argentina (Rossetti *et al.*, 2007), Itália (Acquila *et al.*, 2003b) e República Tcheca (Habart *et al.*, 2003).

As frequências da inv22 e da inv1 foram respectivamente de aproximadamente 42% e 3% nas famílias. Este dado quando comparado aos dados do capítulo 2, não apresentou diferença estatisticamente significativa.

## **Apêndice 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

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

Queremos convidá-lo para participar de um estudo sobre aspectos genéticos relacionados com a Hemofilia. Para o presente projeto estaremos investigando a ocorrência de duas variantes moleculares do gene do fator VIII (**INVERSÕES INV1 E INV22**) em pacientes com hemofilia A no Rio Grande do Sul.

A sua participação voluntária é muito importante para que possamos chegar a conclusões que possam lhe beneficiar, a seus familiares ou a outros pacientes em futuros tratamentos e aconselhamento genético. Você tem o direito de se retirar do estudo a qualquer momento, bastando unicamente manifestar a sua vontade, sem prejuízo de seu tratamento. As informações são confidenciais e as conclusões serão utilizadas para publicações em revistas científicas e congressos científicos, sempre com total sigilo das identidades dos pacientes.

Como os assuntos em medicina evoluem rapidamente, estamos também solicitando o seu consentimento para que o DNA obtido da sua amostra de sangue seja armazenado para esta pesquisa e possa ser analisado para outros fatores, que futuramente venham a serem considerados importantes para esta linha de pesquisa. Eventualmente, seus familiares poderão também ser convidados a participar da pesquisa.

Para realizarmos o estudo é necessário que, além de responder a um questionário, sejam coletados 10mL de sangue de uma veia periférica. O volume coletado não tem repercussão sobre seu organismo e o único desconforto que você poderá sentir será a dor da picada da agulha e eventualmente a formação de um pequeno hematoma.



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

Os resultados dos exames estarão à sua disposição com os pesquisadores responsáveis Leonardo Barbosa Leiria, Eliane Bandinelli e Israel Roisenberg, Laboratório de Hemostasia, Departamento de Genética, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43323, telefone 3308-6728.

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

.....

assinatura do paciente ou responsável legal

.....

assinatura do investigador, pesquisador ou médico responsável

.....

assinatura de testemunha

Declaro que esse formulário foi lido para o paciente

.....em...../...../....., pelo

(a) .....enquanto

eu.....estava presente.

.....

assinatura da testemunha

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

### Apêndice 3. Ficha Clínica dos Pacientes

#### FICHA CLÍNICA DE PACIENTE

DNA n°: \_\_\_\_\_ LOCAL: \_\_\_\_\_ AMOSTRA: \_\_\_\_\_

GENEALOGIA n°: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

#### 1. IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____
Fone 1: _____ Fone 2: _____ Sexo: <input type="checkbox"/> 1- masculino 2- feminino
Data de nascimento: ___/___/___ Idade: _____ Estado Civil: _____
Endereço: _____ Bairro: _____
Cidade: _____ Estado: ___ CEP: _____
Local de nascimento: _____
Nome do pai: _____ Idade: _____
Local de nascimento: _____ Falecido: <input type="checkbox"/> Causa: _____
Nome da mãe: _____ Idade: _____
Local de nascimento: _____ Falecido: <input type="checkbox"/> Causa: _____
Entrevistador: _____

Grupo étnico (impressão do examinador): 1- caucasóide 2- negróide 3- outro

Entre as seguintes opções, como você se classifica em relação à cor da pele?

1- branco 2- negro 3- mulato 4- oriental 5- índio 6- outros

Origem dos avós/bisavós (Europa, África, Ásia - se possível, especificar o país):

\_\_\_\_\_

## 2. HISTÓRICO CLÍNICO

Sintomas (sangramentos): S – Sim; N – Não; P – Prejudicado; R – Raro

1 – Primeira dentição     2 – Dentição definitiva     3 – Equimoses e/ou hematomas

4 – Hemartroses     5 – Epistaxes     6 – Gengivorragias

7 – Hematúria     8 – Melena     9 – Hematemese

10 – Cortes     11 – Cirurgias     12 – Hipermenorréia

13 – Outras hemorragias: \_\_\_\_\_

Primeiros Sintomas: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Tratamentos:  Fator VIII     Crioprecipitado     Feiba (FVII/FII/FX)     Plasma

Outros: \_\_\_\_\_

Causas: \_\_\_\_\_

Frequência do Tratamento: \_\_\_\_\_

Início do Tratamento: \_\_\_\_\_

Último Tratamento (dias): \_\_\_\_\_

Presença de Inibidor: \_\_\_\_\_ Maior Título: \_\_\_\_\_ Menor Título: \_\_\_\_\_

Peso: \_\_\_\_\_

Outros Afetados na Família:  Sim  Não

### 3. HISTÓRIA FAMILIAR

Parentes com histórico de sangramento

	Nome	Grau de Parentesco	Sintomas	Afetado
1				
2				
3				
4				
5				
6				

Heredograma: